

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

DICHTEMESSUNGEN AN BIOLOGISCHEN ZELLEN UND AN ZELL-MODELLEN

Habilitationsschrift
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Jürgen Bernhardt



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546214_0110

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

DICHTEMESSUNGEN AN BIOLOGISCHEN ZELLEN UND AN ZELL-MODELLEN



Habilitationsschrift
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Jürgen Bernhardt

AN DER UNIVERSITÄT LEIDEN
DEPARTMENT BIOLOGIE

DICHTMESSUNGEN
AN BIOLOGISCHEN ZELLEN UND
AN ZELL-MODELLEN



HABILITATIONSTHESE
VON
DR. J. J. VAN DER
WATER
Gedruckt in Leiden

TAG DER HABILITATION: 28. JULI 1977

Weggeleitet von
J. J. VAN DER WAT

1.	<u>Einführung und Problemstellung</u>	Seite 1
2.	<u>Methodik</u>	5
2.1	Hämoglobin	5
2.2	Natriumchlorid	6
2.3	Erythrozyten und Hämolysate	6
2.4	Messung des spezifischen Volumens	7
2.5	Bestimmung des Massenbruchs	8
3.	<u>Theoretische Grundlagen</u>	9
3.1	Gleichungen für pseudobinäre Mischungen	9
3.2	Das spezifische Volumen als Funktion des Massenbruchs	10
3.3	Das partielle spezifische Volumen	10
4.	<u>Ergebnisse</u>	11
4.1	Wasser-Hämoglobin-Natriumchlorid-Mischungen	11
4.2	Natriumchloridlösungen	14
4.3	Bestimmung der partiellen spezifischen Volumen	15
4.4	Erythrozytensuspensionen und Hämolysate	17
5.	<u>Diskussion der Ergebnisse</u>	26
5.1	Wasser-Hämoglobin-Natriumchlorid-Mischungen	26
5.2	Partielles spezifisches Volumen von Oxyhämoglobin und von Methämoglobin	30
5.3	Natriumchloridlösungen	31
5.4	NaCl-Hb-Wechselwirkung in verdünnten Lösungen	32
5.5	Erythrozytensuspensionen und Hämolysate	36

6.	<u>Anhang</u>	42
6.1	Bestimmung der Koeffizienten β_i und der Restfehler; statistische Testverfahren	42
6.2	Einfluss der Viskosität einer Lösung auf die Dichtebestimmung mit der Biegeschwingermethode	48
6.3	Einfluss der Teilchengrösse auf die Dichtebestimmung einer Suspension mit der Biegeschwingermethode	52
6.4	Korrekturformeln für das Zwischenzellvolumen von gepackten Erythrozytensuspensionen	55
6.5	Suspensionen von Kugeln mit Schale als Modelle für Wasser-Hämoglobin-Mischungen	58
7.	<u>Zusammenfassung</u>	75
8.	<u>Literatur</u>	79

1. Einführung und Problemstellung

Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen lebenden und toten Zellen ist der, dass lebende Zellen selektiv gewisse Ionen - wie zum Beispiel Kaliumionen - anreichern, während andere Ionen - wie zum Beispiel Natriumionen - innerhalb des Zytoplasmas in sehr viel geringerer Konzentration vorhanden sind als im Zellaussenraum.

Da die Zellmembran sowohl für Kationen als auch für Anionen permeabel ist, muss es auf Grund thermodynamischer Überlegungen Mechanismen geben, die für diese Ionenverteilung, die in einem statischen System nicht zulässig ist, verantwortlich sind. Diese Mechanismen nennt man herkömmlicherweise "Ionenpumpen". Ionenpumpen sollen unter Verwendung von Energie das für eine lebende Zelle charakteristische intrazelluläre Ionenmilieu aufrechterhalten. Die Tatsache, dass Ionenflüsse durch die Zellmembran dem elektrochemischen Gradienten folgen, konnten Hodgkin und Huxley³⁴ für Nervenfasern während des Ablaufs des Aktionspotentials zeigen. Nach Ablauf des Aktionspotentials an der Membran einer erregbaren Zelle stellen die "Ionenpumpen" die ursprüngliche Ionenverteilung wieder her.

Seit etwa 15 Jahren versucht eine kleine Gruppe von Physiologen und Biophysikern, das "klassische" Membrankonzept mit Pumpen für den aktiven Transport durch ein anderes Modell zu ersetzen.^{31,44,45,78} Dieses Modell geht davon aus, dass die Zellproteine aufgrund ihrer Eigenschaften und infolge ihrer hohen Konzentration eine besondere Struktur des Zellwassers bewirken, verglichen mit verdünnten Proteinlösungen. Das Zellwasser wird nicht so stark "strukturiert" wie Eis, jedoch mehr "strukturiert" als normales Wasser angenommen. In diesem Modell sind die Kationen als assoziiert zu betrachten, je nach Art des Ions verschieden stark. Vor allem lassen sich Beobachtungen, die aus Untersuchungen mit magnetischen Kernresonanzmethoden (NMR) gewonnen wurden, recht einfach mit diesem Modell erklären. Vielleicht ausgelöst durch diese Gruppe von Wissenschaftlern hat das Interesse an der Rolle und am Zustand des Wassers in biologischen Systemen in den letzten Jahren stark zugenommen.^{27,31}

Das zeigt auch eine Diskussion, die z.Z. in der Zeitschrift "Science" ausgetragen wird.^{3,15,23,24,32,40,46,47,82}

Der thermodynamische Zustand des Zytoplasmas in der Zelle, sowie die Rolle des Wassers und der kleinen Ionen wurden mit sehr verschiedenen Methoden untersucht. Zu diesen Methoden, aus denen man Informationen über das "gebundene" Wasser erhält, gehören Adsorptionsmessungen¹⁶, kalorische Messungen der Schmelzwärme^{6,29,30,5}, Messungen der spezifischen Wärme^{18,51}, dielektrische Messungen^{56,64,7}, Leitfähigkeitsmessungen⁵³⁻⁵⁶, Diffusionsmessungen¹, Analysen der Röntgenstrahlbeugung^{11,12,35} und NMR-Messungen^{5,22,31,49,52}.

Das Bild, welches heute überwiegend über die Wechselwirkung zwischen Makromolekülen und Wasser in biologischen Systemen vertreten wird, ist das folgende.^{5,42,56,21}

Biologische Makromoleküle besitzen - neben Bindungsstellen für Salzionen - auch verschiedene spezifische Bindungsstellen für Wasser. Einige Wassermoleküle sind fest innerhalb des Moleküls gebunden und spielen offensichtlich eine Rolle für die Struktur des Makromoleküls, andere Wassermoleküle sind fest an der Oberfläche gebunden. Es ist heute möglich, für einige Proteine sowohl die Anzahl als auch die Koordinaten solcher fest gebundenen Wassermoleküle anzugeben.^{11,12,35} Das geschieht durch verfeinerte, computergestützte Auswertungen von Elektronendichtediagrammen, die aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden. Man nimmt an, dass - zumindest für Proteine - je 100g Protein etwa 3 bis 10g Wasser spezifisch und fest gebunden sind.

Zusätzlich zu diesem spezifisch gebundenen Wasser werden noch weitere Wassermoleküle in der Zelle durch das Makromolekül in dem Sinne beeinflusst, dass die Beweglichkeit dieser Wassermoleküle gegenüber "normalen" Wassermolekülen reduziert ist. Verschiedene Untersuchungsmethoden erfassen je nach Art einen unterschiedlichen Anteil dieses unspezifisch, "locker gebundenen" Wassers; deshalb sind Angaben über die Menge des gebundenen Wassers abhängig von der Untersuchungsmethode.

Insgesamt ergibt sich, dass je 100g Protein etwa 50g Wasser durch das Protein beeinflusst werden kann. Da eine "Durchschnittszelle" etwa 20% Protein und 70% Wasser enthält, bedeutet das, dass etwa 85% des Zellwassers der Durchschnittszelle "frei" sind und sich

wie Wasser in einer entsprechend zusammengesetzten Elektrolytlösung verhält. 0,5g Wasser pro g Protein entsprechen etwa einer Wasserschichtdicke um das Proteinmolekül, die dem Durchmesser von 2 Wassermolekülen entspricht. Ob dieses spezifisch und unspezifisch gebundene Wasser eine wesentliche Rolle in biologischen Systemen bzgl. Ionenspezifität, spezifischen Bindungseigenschaften des Zytoplasmas und Membranpermeabilität spielt, ist noch ungeklärt.⁵ Sollte tatsächlich das ganze Zellwasser eine besondere Struktur haben, so muss diese so schwach sein, dass sie sich den meisten Untersuchungsmethoden bisher entzogen hat.

Die vorliegende Arbeit soll von einer neuen Seite her einen Beitrag zum Verständnis des thermodynamischen Zustandes des Zytoplasmas und des Wassers in der Zelle liefern. Die verwendete Untersuchungsmethode ist sehr elementar, dafür vielleicht beweiskräftiger. Mit Hilfe eines mechanischen Oszillators (Biegeschwinger-methode)^{74,75} wurden Dichtemessungen an biologischen Zellen und an Modellösungen durchgeführt. Aufgrund des Messprinzips ist es möglich, die Dichte von kleinen Proben sehr genau zu bestimmen. Als Zellen wurden Erythrozyten vom Rind gewählt. Die Untersuchungen erfolgten in drei aufeinanderfolgenden Stufen zunehmender Komplexität. Zunächst wurden salzfreie Hämoglobin-Wasser-Mischungen untersucht. Dann wurde der Einfluss eines Salzes studiert. Schließlich wurden Messungen an Zellsuspensionen vorgenommen.

Dichtemessungen an wässrigen Lösungen von Proteinen sind nicht neu^{13,17,36,37,61} (s. auch Literatur bei Kupke⁴³). Auch das verwendete Densimeter wurde für Volumenmessungen an verdünnten Proteinlösungen entwickelt^{41,74,75}, da sehr genaue Werte für das partielle spezifische Volumen eines Proteins bei Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung benötigt wurden. Neu in dieser Arbeit ist die Ausdehnung solcher Messungen auf hohe Konzentrationen von Proteinmischungen und auf Zellen. Die dabei auftretenden speziellen Einflüsse solcher Systeme auf den Biegeschwinger werden eingehend untersucht.

Um die hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Dichtemessungen mit einem Biegeschwinger ausnutzen zu können, mussten die bisher verwendeten Methoden zur Bestimmung der Konzentration der Komponenten in den untersuchten Lösungen wesentlich verbessert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Methode entwickelt und ausführlich beschrieben. Auf diese Weise war es möglich, aus Dichtemessungen an Protein-Salz-Wasser-Mischungen Aussagen über die Wechselwirkung des Wassers mit Protein, über die Bindung von Ionen an Protein sowie über die Wechselwirkung von Proteinmolekülen untereinander zu machen. Schliesslich ist es möglich, das Partialvolumen des Wassers im Erythrozyten mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Es zeigte sich, dass selbst bei der erreichten hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse kein Anhaltspunkt für eine spezifische Struktur des Wassers im Erythrozyten besteht, obwohl der Anteil der Proteine in Erythrozyten sehr viel grösser ist als bei allen anderen Zellen.

2. Methodik

2.1 Hämoglobin

Hämoglobin vom Rind (Hb) wurde nach der Methode von Drabkin²⁵ und Hinson³³ präpariert. Die mit dieser Methode gewonnene teilchenfreie Hämoglobinlösung wurde anschliessend entionisiert und konzentriert nach einer Technik, die von Pfister und Tretter⁷⁷ entwickelt wurde. Für die Entsalzung wurde das Ionenaustauscher-Mischbettharz AG 501-X8 (D) von Bio-Rad.Corp. verwendet. Die spezifische Leitfähigkeit der Hb-Lösung (10% Hb) war kleiner als $5 \mu\text{Scm}^{-1}$. Die Hb-Lösungen wurden mit Hilfe eines Sartorius-Ultrafiltrationssystems aufkonzentriert. Die erhaltenen Hb-Mischungen enthielten bis zu 0,45g Hb/g Mischung (Massengehalt 0,45). Kleine Proben dieser Mischungen wurden in Plastikbeuteln bei -30°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Reinheit der Hb-Präparation wurde durch Gel-Filtration geprüft (mit Sephadex G 150 und G 100). Es ergab sich ein einzelner normaler Peak ohne andere Peaks, die auf das Vorhandensein von anderen Proteinen hinwiesen.⁷¹ Für einzelne Fraktionen des Peaks wurde ausserdem die optische Dichte bei 415nm und 280nm gemessen. Das Verhältnis der beiden Extinktionen war konstant innerhalb des Hb-Peaks und charakteristisch für Oxyhämoglobin. Eine quantitative Bestimmung ergab, dass der Massenanteil an Fremdproteinen sicher kleiner als 1%, wahrscheinlich sogar kleiner als 0,4% war.

Nach dem Auftauen einer Probe wurde der Hb-Gehalt durch Messung der Trockenmasse bestimmt. Die H_2O -Hb-NaCl-Mischungen wurden hergestellt, indem kleine definierte Salzmen gen schrittweise in die Hb-Mischungen eingewogen wurden. Für die Berechnung der Proteinmolalität wurde ein Molekulargewicht von 64500 benutzt.² Für die Messungen des spezifischen Volumens wurden die Mischungen

dann schrittweise mit Wasser verdünnt. Die pH-Werte der Mischungen lagen zwischen 7,10 und 7,28 (Unsicherheit $\pm 0,05$ Einheiten), abhängig von der Salz- und Proteinkonzentration.

Methemoglobin vom Rind (Mb) wurde durch Oxydation des Hb mit $K_3[Fe(CN)_6]$ hergestellt⁶²; anschliessend wurde die Mb-Lösung entsalzt.

2.2 Natriumchlorid

Das verwendete Salz war NaCl Suprapur von Merck. Es wurde bei 150°C getrocknet. Alle Lösungen wurden durch Einwaage hergestellt, die eingewogenen Massen bzgl. Auftrieb korrigiert. Das verwendete Wasser war entionisiert und doppelt destilliert. Das gleiche Wasser wurde auch zur Eichung des Densimeters verwendet.

Vor der Herstellung der Salzlösungen wurde das Wasser entgast; die Salzlösungen wurden noch einmal entgast, schliesslich wurde der Wassergehalt durch Einwaage bestimmt. Auf diese Weise konnten mögliche Fehler durch Verdunstung und durch gelöste Gase klein gehalten werden.

2.3 Erythrozyten und Hämolysate

Erythrozyten wurden aus Rinderblut gewonnen. Frisches Citratblut vom Schlachthof wurde zentrifugiert und das Sediment zweimal mit physiologischer Krebs-Ringer-Phosphatlösung⁷⁹, pH 7,4, (KRP; 0,9%), gewaschen. Die weitere Verarbeitung der Erythrozyten erfolgte in KRP-Lösungen, die bis zu 15% konzentrierter oder verdünnter als die physiologische KRP-Lösung waren. Auf diese Weise wurde eine osmotische Schrumpfung oder Schwellung der Erythrozyten innerhalb physiologischer Grenzen erreicht.

Die gewaschenen Erythrozyten wurden dazu bei 25°C in die jeweiligen Endlösungen inkubiert und nochmals zweimal gewaschen. Anschliessend wurden die Erythrozyten nochmals für 30 min bei 25°C inkubiert und fest gepackt. Die Hämatokritwerte dieser festgepackten Sedimente lagen zwischen 98,5 und 100%. Diese Sedimente wurden für die Messung des spezifischen Volumens und der Trockenmasse verwendet.

Um zu testen, ob bei den osmotischen Veränderungen der Zellen nur Wasser- und keine Salzverschiebungen auftraten, wurde flammenphotometrisch die Konzentration der Na^+ - und K^+ -Ionen, titrimetrisch der Gehalt an Cl^- -Ionen bestimmt.

Zur Herstellung von Hämolysaten wurden Sedimente verwendet, die aus geschrumpften Erythrozyten bestanden. Die Proben wurden zu diesem Zweck langsam eingefroren (-30°C) und wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt. Nach dieser Prozedur enthielt das Hämolysat praktisch keine ganzen Erythrozyten mehr, wie die mikroskopische Beobachtung zeigte. Für die weiteren Messungen wurden die Proben genauso wie die Proteinmischungen schrittweise mit Wasser verdünnt.

2.4 Messung des spezifischen Volumens

Das spezifische Volumen wurde mit dem Densimeter DMA 02 C von Heraeus/Paar, entwickelt von Kratky u.a.⁴, gemessen. In diesem Densimeter wird die ungedämpfte Schwingung eines Biegeschwingers gemessen. Der Biegeschwinger wird mit der Messprobe gefüllt und ändert dadurch seine Eigenfrequenz. Dabei nimmt ein exakt definiertes Volumen der Probe an der Schwingung teil. Die Messproben wurden mit Hilfe von zwei Thermostaten auf einer Temperatur von $25,00 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ gehalten. Das Densimetergerät wurde vor jeder Messung mit Luft bekannter Dichte, sowie mit entionisierten und doppelt destillierten Wasser (spezifisches Volumen $1,002964\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ bei 25°C^{10}) kalibriert.

Die Bestimmung des spezifischen Volumens hochkonzentrierter Proteinlösungen durch die ungedämpfte Eigenschwingung eines Biegeschwingers setzt voraus, dass viskoelastische Eigenschaften der Messprobe die Eigenfrequenz nicht beeinflussen. Durch eine Reihe von Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Beeinflussung der Dichtemessung durch die Viskosität der Probe, falls überhaupt, jedenfalls kleiner als $4 \times 10^{-5}\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ist. Die dafür entscheidenden Experimente werden in Anhang 6.2 beschrieben. Die Messunsicherheit des Densimeters wird mit $2 \times 10^{-6}\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ angegeben.

Die experimentellen Unsicherheiten in den Werten für das spezifische Volumen von Proteinlösungen wurden praktisch allein durch die Unsicherheiten bei der Messung der Trockenmasse (s. Gl. 17 und Abb. 13 im Anhang 6.1) bestimmt. Wir erhielten Werte für die Unsicherheiten σ_i , die zwischen etwa $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ für verdünnte Lösungen und etwa $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ für hohe Proteinkonzentrationen lagen.

Die Unsicherheiten in den Werten für das spezifische Volumen von Erythrozytensuspensionen sind etwa $6 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

2.5 Bestimmung des Massenbruchs

Die Einzelheiten der Bestimmung des Massenbruchs sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden^{7,8}. Das Wesentliche der Methode sei hier noch einmal kurz zusammengefasst. Zunächst wurde das Feuchtgewicht der Proben unter Berücksichtigung von Verdunstung und Auftrieb bestimmt. Nach einer Gefriertrocknung wurden die Proben bei $110\text{--}112^\circ\text{C}$ in einem Vakuumofen bei etwa $1,3 \text{ Pa}$ (10^{-2} Torr) getrocknet. Die anschließende Bestimmung der Trockenmasse erfolgte in einer speziellen "Glove Box", die mit trockenem Stickstoff gespült wurde. Der Trockenprozess im Vakuumofen wurde noch einmal in Gegenwart von Phosphorpentoxyd (P_2O_5) wiederholt. Alle Massenbestimmungen erfolgten mit einer Elektrowaage der Fa. Cahn.

Proben mit verschiedenen Proteinkonzentrationen wurden verwendet, um die Standardabweichung der Trockengewichtsbestimmung zu erhalten. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt. Die durchgezogene Kurve wurde für die mathematische Anpassung der experimentellen Daten verwendet.

Die Standardabweichung bei der Bestimmung der Trockenmasse von Erythrozytensedimenten betrug etwa $2,5 \times 10^{-4}$.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Gleichungen für pseudobinäre Mischungen

In der Theorie der Mischungen²⁸ wird das Volumen V eines Vielkomponentensystems mit der Masse m_1 von Wasser (Index 1), m_2 von Hämoglobin (Index 2), m_3 von NaCl (Index 3) und $\sum_{i=4}^n m_i$ von anderen Komponenten wie Lipide, andere Salze und Proteine etc., durch folgende Gleichung dargestellt:

$$(1) \quad V = v_1 m_1 + v_2 m_2 + v_3 m_3 + \sum_{i=4}^n v_i m_i .$$

Mit dem spezifischen Volumen $v = V / \sum_{i=1}^n m_i$, dem Massenbruch w der Trockensubstanz,

$$(2) \quad w = \frac{\sum_{i=2}^n m_i}{\sum_{i=1}^n m_i} ,$$

und dem Massenverhältnis α_j einer Komponente j in der Trockensubstanz,

$$(3) \quad \alpha_j = m_j / \sum_{i=2}^n m_i ,$$

erhält man aus Gl. 1 für eine pseudobinäre Mischung (d.h. $\alpha_j = \text{const}$):

$$(4) \quad v = v_1 (1-w) + v_T w ;$$

dabei ist v_1 das partielle spezifische Volumen des Wassers in der Mischung und v_T das partielle spezifische Volumen der Trockensubstanz. Es ist

$$(5) \quad v_T = \alpha_2 v_2 + \alpha_3 v_3 + \sum_{i=4}^n \alpha_i v_i .$$

Die einzige Variable ist hier Wasser, die α_i müssen für eine Messreihe konstant bleiben. Die Gleichungen lassen sich einfach auch für eine andere Variable umschreiben; entsprechend andere Massenverhältnisse müssen dann für die Messungen konstant bleiben.

3.2 Das spezifische Volumen als Funktion des Massenbruchs

Die experimentellen Daten wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate^{9,14} (s. Anhang 6.1) durch eine Potenzreihe angepasst:

$$(6) \quad v = \beta_0 + \beta_1 w + \beta_k w^k + \beta_l w^l .$$

Die sich ergebenden Potenzen und Koeffizienten β_j sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Um in den Abbildungen den relativ kleinen Einfluss der Protein-Protein-Wechselwirkung zu zeigen, der bei hohen Proteinkonzentrationen auftritt, wird die Funktion Δv ,

$$(7) \quad \Delta v = v - \beta_0 - \beta_1 w \quad \text{oder mit Gl. 6}$$

$$(8) \quad \Delta v = \beta_k w^k + \beta_l w^l$$

als Funktion von w dargestellt.

3.3 Das partielle spezifische Volumen

Die partiellen spezifischen Volumen v_1 und v_T wurden aus den Gleichungen 9 und 10 berechnet²⁸,

$$(9) \quad v_1 = v - w \left(\frac{\partial v}{\partial w} \right)_{T,p} ,$$

$$(10) \quad v_T = v + (1-w) \left(\frac{\partial v}{\partial w} \right)_{T,p} .$$

Mit Gl. 6 erhält man für das partielle spezifische Volumen des Wassers v_1^0 , extrapoliert für unendlich verdünnte Lösungen,

$$(11) \quad v_1^0 = \beta_0 ,$$

und für das partielle spezifische Volumen v_T^∞ der Trockensubstanz, extrapoliert für unendlich verdünnte Lösungen

$$(12) \quad v_T^\infty = \beta_0 + \beta_1 .$$

4. Ergebnisse

4.1 Wasser-Hämoglobin-Natriumchlorid-Mischungen

Es wurde das spezifische Volumen von salzfreien Hämoglobinmischungen und von Mischungen mit drei verschiedenen Massenverhältnissen α von Natriumchlorid gemessen (α_3 aus Gl. 3 wird im weiteren Text einfach α genannt). Die α -Werte entsprechen NaCl-Konzentrationen von etwa 75 mmol/kg Wasser, 100 mmol/kg und 200 mmol/kg Wasser, jeweils für Mischungen, die 350g Hb/kg Mischung enthalten. Diese Werte überstreichen den physiologischen Bereich von H_2O -Hb-NaCl-Mischungen in Rindererythrozyten. Die Messpunkte für $\alpha=0$ und $\alpha=0,02133$ sind als Darstellung von Δv als Funktion von w (Gl. 7) in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben. Die Koeffizienten β_i , berechnet nach der Methode der kleinsten Quadrate (s. Anhang 6.1), sind in Tabelle 1 angegeben. Die durchgezogenen Kurven in Abb. 1 und 2 entsprechen Gl. 8.

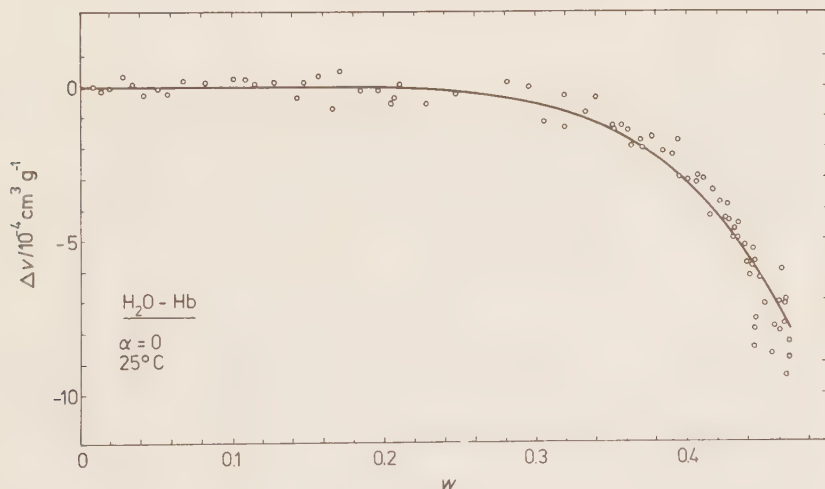


Abb. 1: Experimentelle Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i für das spezifische Volumen von dem linearen Teil der Gl. 6, $\Delta v_i = v_i - \beta_0 - \beta_1 w_i$, als Funktion des Massegehalts w des Hämoglobins in einer Wasser-Hämoglobin-Mischung, $w = m_2 / (m_1 + m_2)$. Die durchgezogene Kurve entspricht Gl. 8 mit $k = 6$ und $\beta_1 = 0$ (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Koeffizienten β_i für die Darstellung des spezifischen Volumens als Potenzreihe (Gl. 6), Massenverhältnis $\alpha = m_3/m_2+m_3$, Anzahl N der Messpunkte, Minimumfunktion M (Gl. 16) und die maximalen Werte für den Massengehalt $w_{\max}$ der Trockenmasse. Die Zahlen unter den letzten Ziffern sind Werte für die Unsicherheiten der Koeffizienten (s. Anhang 6.1).

α	$\frac{\beta_0}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_1}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_{3/2}}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_4}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_5}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_6}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_7}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	N	M	$w_{\max}$
0	+ 1,002982 ₇	- 0,249832 ₄₅	0	0	0	- 0,0765 ₄₁	0	80	221	0,466
0,00810 ₁	+ 1,002970 ₉	- 0,253361 ₇₅	0	0	- 0,022 ₁₆	0	- 0,049 ₈₉	36	76,3	0,446
0,01072 ₁	+ 1,002953 ₅	- 0,254361 ₅₀	0	+ 0,0044 ₂₅	0	0	- 0,160 ₂₉	42	31,7	0,468
0,02133 ₁	+ 1,002959 ₆	- 0,259022 ₅₆	0	+ 0,0202 ₂₆	0	0	- 0,311 ₃₀	42	44,4	0,464
1	+ 1,002963 ₁	- 0,71625 ₄₀	+0,1274 ₂₇	0	0	0	0	123	135	0,024

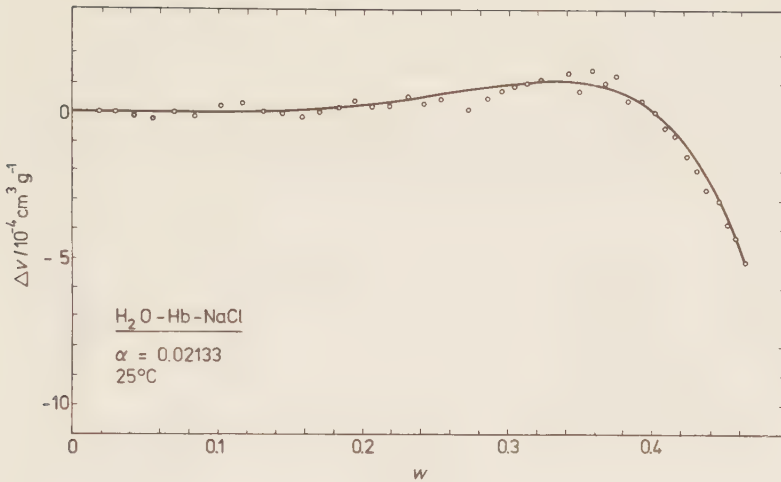


Abb. 2: Experimentelle Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i für das spezifische Volumen von dem linearen Teil der Gl. 6 als Funktion des Massengehalts w der "trockenen" Komponente Hb-NaCl, $w = (m_2 + m_3)/(m_1 + m_2 + m_3)$, Gl. 2; $\alpha = 0,02133$ oder $0,02179$ g NaCl pro g Hb. Die durchgezogene Kurve entspricht Gl. 8 mit $k = 4$ und $l = 7$ (s. Tab. 1).

Abbildung 3 zeigt die besten angepassten Funktionen $\Delta v(w)$ für alle vier Messreihen. In dieser Abbildung sind auch Restfehler von v für einige ausgewählte w -Werte angegeben (Berechnung von Restfehlern s. Anhang 6.1).

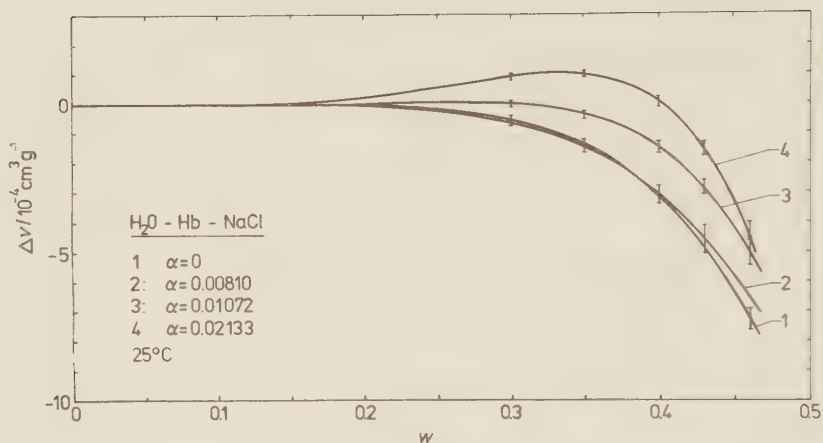


Abb. 3: Abweichung Δv_i des spezifischen Volumens vom linearen Teil der Gl. 6 als Funktion des Massengehalts w der "Trockenkomponente" für 4 Werte von α . Die 4 Kurven entsprechen Gl. 8 mit Werten für die Koeffizienten β_i aus Tab. 1. Die Fehlerbalken geben Restfehler an.

4.2 Natriumchloridlösungen

Abbildung 4 zeigt die Werte Δv_i als Funktion von w_i aus 123 Messungen an Lösungen mit kleinen und physiologischen NaCl-Konzentrationen. Die Werte für die Koeffizienten der besten Anpassung sind Tab. 1 ($\alpha = 1$) angegeben; die durchgezogene Kurve in Abb. 4 entspricht dieser Anpassung.

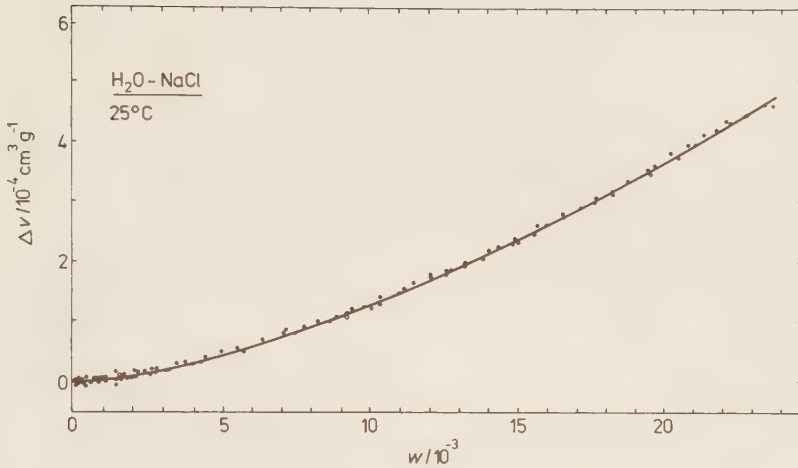


Abb. 4: Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i für das spezifische Volumen vom linearen Teil der Gl. 6, $\Delta v_i = v_i - \beta_0 - \beta_1 w_i$, als Funktion des Massengehalts w von Natriumchlorid in Wasser, $w = m_3/(m_1+m_3)$. Die durchgezogene Kurve entspricht Gl. 8 mit $k = 1,5$ und $\beta_1 = 0$ (s. Tab. 1). Der Massengehalt $w = 0,02$ entspricht einer Lösung mit 0,349 mol NaCl pro kg Wasser.

4.3 Bestimmung der partiellen spezifischen Volumen

Die partiellen spezifischen Volumen wurden aus Gl. 9 und Gl. 10 mit den Koeffizienten aus Tab. 1 berechnet. Wie aus den β_0 -Werten in Tab. 1 hervorgeht, gibt es kleine systematische Abweichungen dieser Werte im Vergleich zum Wert v_1^0 für reines Wasser, $v_1^0 = 1,002964 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Diese systematischen Verschiebungen wurden bei der Berechnung der partiellen spezifischen Volumen berücksichtigt. In Abbildung 5 ist das partielle spezifische Volumen v_1 des Wassers als Funktion von w für alle Messreihen dargestellt. Für einige w -Werte sind ausserdem die Restfehler angegeben.

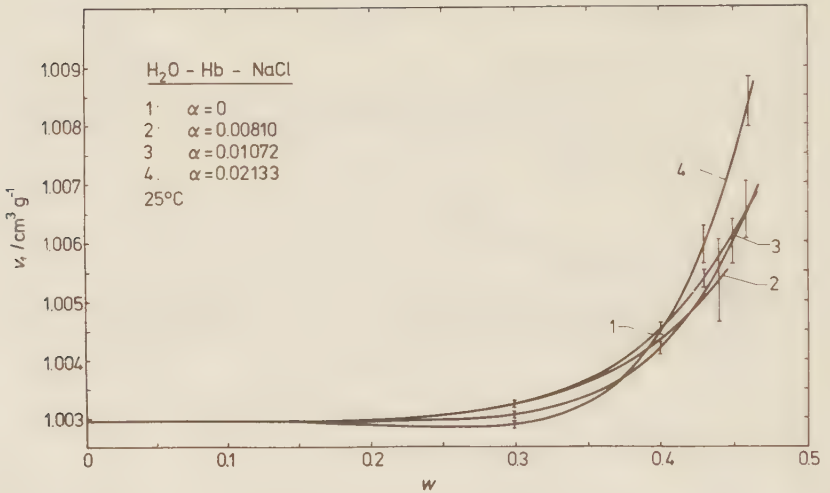


Abb. 5: Partielles spezifisches Volumen v_1 von Wasser als Funktion von w für verschiedene Werte von α . Die Balken entsprechen den Restfehlern in v_1 .

In Abbildung 6 ist das partielle spezifische Volumen $v_T = v_{23}$ der Trockenmasse als Funktion von w zusammen mit Restfehlern für alle Messreihen dargestellt.

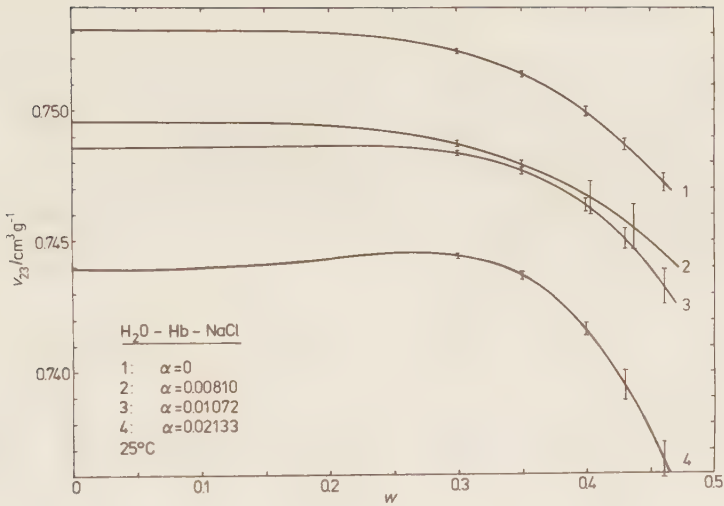


Abb. 6: Partielles spezifisches Volumen v_{23} der "Trockenkomponente" als Funktion des Massengehalts w der Komponente (Hb+NaCl) für 4 verschiedene Werte von α . Die Balken entsprechen den Restfehlern in v_{23} .

4.4 Erythrozytensuspensionen und Hämolysate

In 14 Messreihen wurde das spezifische Volumen von gepackten Rindererythrozyten gemessen. Jede Messreihe bestand aus mehreren Proben von Suspensionen, die osmotisch unterschiedlich vorbehandelt worden waren (s. Abschnitt 2.3). Die Messpunkte für eine dieser Messreihen sind als Darstellung von Δv als Funktion von w (Gl. 7) in Abb. 7 dargestellt.

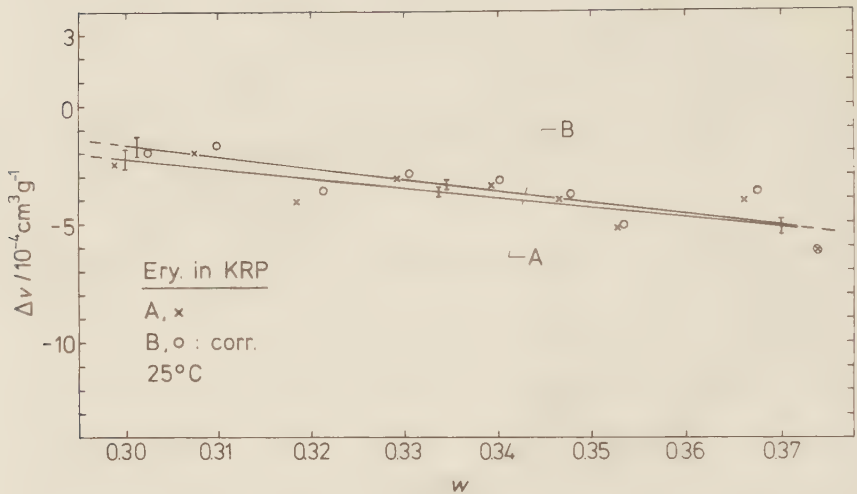


Abb. 7: Experimentelle Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i von dem linearen Teil der Gl. 6, $\Delta v_i = v_i - 1,002964 + 0,255 w$, als Funktion des Massengehalts w der "Trockenmasse" in Erythrozytensuspensionen, die osmotisch verschieden vorbehandelt worden waren. x : Messpunkte, o : korrigierte Messpunkte (s. Text), die Messpunkte sind Mittelwerte von je zwei Messungen an derselben Probe. Die durchgezogenen Geraden entsprechen Gl. 8 mit β_1 und $\beta_1 = 0$ (s. Tab. 2). Die Fehlerbalken entsprechen den Restfehlern in v .

Der Packungsanteil der gemessenen Proben wurde mit einer Hämatokritzentrifuge bestimmt; die Hämatokritwerte lagen zwischen 0.985 und 1.0. Mit den bekannten Werten des Volumenanteils und des spezifischen Volumens der Zwischenzellflüssigkeit wurden sowohl die gemessenen v -Werte als auch die w -Werte auf eine 100%ige Suspension umgerechnet. Die Korrekturformeln sind in Anhang 6.4 abgeleitet. Die korrigierten Werte sind ebenfalls in Abbildung 7 angegeben.

Für beide Datengruppen wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate die Koeffizienten β_i berechnet (s. Anhang 6.1).

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2: Koeffizienten β_0 und β_1 für die Darstellung des spezifischen Volumens v_0 von Erythrozytensuspensionen als Funktion des Massegehalts w der "Trockenkomponente" (Gl. 6), Anzahl N der Messpunkte, Minimumfunktion M (Gl. 16). $(\beta_0 + \beta_1)$ ist das konzentrationsabhängige partielle Volumen der "Trockenkomponente". Die Zahlen unter den letzten Ziffern der Werte geben die Unsicherheiten in den Koeffizienten an. Datengruppe B ist aus Datengruppe A nach Korrektur bzgl. Zwischenzellflüssigkeit berechnet worden.

Daten- gruppe	$\frac{\beta_0}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_1}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_0 + \beta_1}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	N	M
A	1,00402 28	- 0,25925 83	0,74475 55	9	11,5
B	1,00429 29	- 0,25997 86	0,74432 57	9	12,0

Es ergab sich, dass bei dieser Messreihe und bei den übrigen 13 Messreihen ein Koeffizient β_k , $k \geq 2$, keine signifikante Verbesserung des Datenfits brachte. Daher wurden alle Messreihen durch Geraden dargestellt. Die durchgezogenen Geraden in Abbildung 7 entsprechen dieser Anpassung.

Es zeigte sich bei der Auswertung der Messdaten aller 14 Messreihen, dass die Streuung der Messdaten innerhalb einer Messreihe oft kleiner waren als die Streuung zwischen den Messreihen; durch einen statistischen F-Test wurde geprüft, welche Datengruppen zusammengefasst werden dürfen. Dieses Testverfahren wird genauer in Anhang 6.1 beschrieben. Als Ergebnis bilden sich 5 Gruppen von Daten, die sich nach dem Test jeweils signifikant voneinander unterscheiden. Diese 5 Gruppen sind zusammen mit den dazugehörigen Ausgleichsgeraden und Restfehlern in Abbildung 8 dargestellt, und zwar sind die bzgl. der Zwischenzellflüssigkeit korrigierten Werte verwendet worden.

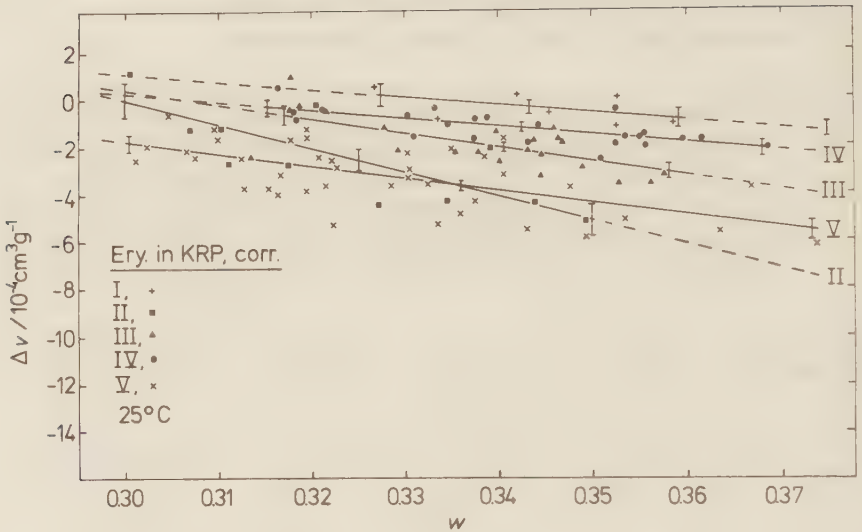


Abb. 8: Experimentelle Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i von dem linearen Teil der Gl. 6, $\Delta v_i = v_i - 1,002964 + 0,255 w$, als Funktion des Massengehalts w der "Trockenmasse" in Erythrozytensuspensionen. Die Messpunkte sind Mittelwerte von je zwei Messungen an derselben Probe und bzgl. Zwischenzellflüssigkeit korrigiert worden. Die Messdaten sind in 5 Gruppen zusammengefasst, die sich jeweils signifikant voneinander unterscheiden (s. Anhang 6.1). Die durchgezogenen Geraden entsprechen Gl. 8 mit β_k und $\beta_1 = 0$ (s. Tab. 3), die zusammengehörenden Punkte und Geraden sind in der Abbildung angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen den Restfehlern in v .

Die Koeffizienten β_i , die sich aus dem Datenfit der 5 Gruppen ergeben, sind in Tabelle 3 angegeben, zusammen mit den Unsicherheiten der Koeffizienten, der Anzahl der Messpunkte, der Minimumfunktion und der Anzahl der Messreihen, aus denen die Gruppe besteht. Der untere Teil der Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte β_0 und $(\beta_0 + \beta_1)$, die sich aus den Gruppen mit ihren verschiedenen Gewichten ergeben.

Tab. 3: Koeffizienten β_0 und β_1 für die Darstellung des spezifischen Volumens von Erythrozytensuspensionen als Funktion des Massegehalts w der "Trockenkomponente" (Gl. 6), sowie Anzahl N der Messpunkte, Minimumfunktion M (Gl. 16) für insgesamt 5 Gruppen von Daten. t ist die Anzahl der Messreihen pro Gruppe, $(\beta_0 + \beta_1)$ das partielle spezifische Volumen der "Trockenkomponente". In der letzten Zeile sind die Mittelwerte β_0 und $(\beta_0 + \beta_1)$ angegeben, die sich aus den Gruppen mit ihren verschiedenen Gewichten ergeben. Die Zahlen unter den letzten Ziffern der Werte geben die Unsicherheiten in den Koeffizienten bzw. die Restfehler an. Für die Datenanpassung sind Messwerte verwendet worden, die bzgl. Zwischenzellflüssigkeit korrigiert worden waren.

Gruppe	$\frac{\beta_0}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_1}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	$\frac{\beta_0 + \beta_1}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}}$	N	M	t
I	1,00409 74	- 0,2584 22	0,7457 14	7	5,34	1
II	1,00603 85	- 0,2652 26	0,7407 18	11	49,2	2
III	1,00484 32	- 0,2611 10	0,7437 6	22	39,3	3
IV	1,00407 29	- 0,2586 8	0,7455 6	23	14,9	3
V	1,00436 33	- 0,2602 10	0,7441 7	40	129,9	5
Mittel- werte	1,00445 17		0,7445 4			

Die Abbildungen 9 - 11 enthalten Ergebnisse, die aus Messungen des spezifischen Volumens von hämolysierten Erythrozytensuspensionen erhalten wurden. Die Hämolysate wurden aus gepackten Sedimenten geschrumpfter Erythrozyten derjenigen Messreihe hergestellt, die für Abbildung 7 verwendet wurde. Das Hämolysat wurde in zwei Proben unterteilt,

von denen die eine jeweils vor der Dichtemessung entgast wurde. Die Messpunkte und die der Gl. 8 entsprechenden Kurven mit den Restfehlern sind für beide Datengruppen in Abbildung 9 gezeigt. Die Koeffizienten β_i , die sich aus dem Datenfit ergeben, sind in Tabelle 4 angegeben. Zusätzlich sind in Abbildung 9 Messpunkte mit der Ausgleichsgeraden eingezeichnet, die aus Messungen mit Erythrozytensuspensionen gewonnen wurden (nicht korrigierte Werte); es handelt sich um die Messreihe, die in Abbildung 7 dargestellt ist.

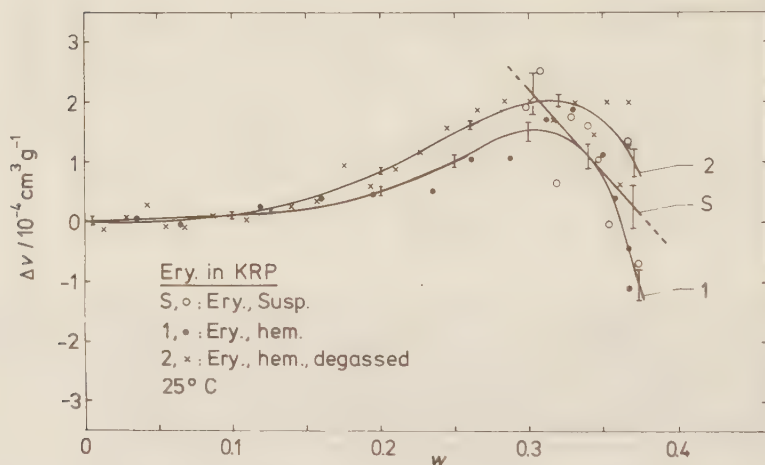


Abb. 9: Experimentelle Abweichung Δv_i der Messpunkte v_i von dem linearen Teil der Gl. 6, $\Delta v_i = v_i - \beta_0 + 0,256474w$, als Funktion von w für hämolysierte Zellsuspensionen. Der Ausgangspunkt der Messreihen waren zwei Proben desselben Hämolysats, die Proben einer Messreihe (2;x) waren vor jeder Messung entgast worden. Zusätzlich sind Messpunkte aus Abb. 7 eingezeichnet, die aus Messungen an Erythrozytensuspensionen gewonnen wurden. Die durchgezogenen Kurven entsprechen der Gl. 8, und die Fehlerbalken den Restfehlern in v .

Tab. 4: Koeffizienten β_i für die Darstellung des spezifischen Volumens von hämolysierten Erythrozytensuspensionen als Funktion von w . Gruppe 1: nicht entgaste Proben, Gruppe 2: entgaste Proben. Die Zahlen unter den letzten Ziffern der Werte geben die Unsicherheiten in den Koeffizienten an. In den letzten Spalten ist die Anzahl N der Messpunkte und die Minimumfunktion angegeben.

Daten- gruppe	β_0 $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	β_1 $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	β_3 $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	β_6 $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	β_7 $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	N	M
1	1.002975 11	- 0.25636 9	0	1.04 18	- 2.93 48	14	22.0
2	1.002993 7	- 0.25647 9	0.0115 16	0	- 0.501 77	25	33.7

In den Abbildungen 10 und 11 sind zusammenfassend die partiellen spezifischen Volumen dargestellt, die sich mit den Gl. 9 und 10 für alle Messreihen an Erythrozytensuspensionen und Hämolysaten ergeben.

In Abbildung 10 ist das partielle spezifische Volumen v_1 des Wassers, in Abbildung 11 das partielle spezifische Volumen v_T der "Trockenkomponente" als Funktion von w gezeigt. Die Kurven 1 und 2 entsprechen den beiden Hämolysaten (Kurve 2: entgaste Hämolysate); die beiden Geradenstücke A und B entsprechen den Erythrozytensuspensionen, die in Abbildung 7 dargestellt sind; und der schraffierte Bereich ergibt sich als Mittelwert aller Messungen an Erythrozytensuspensionen (s. Abb. 8 und Tab. 3).

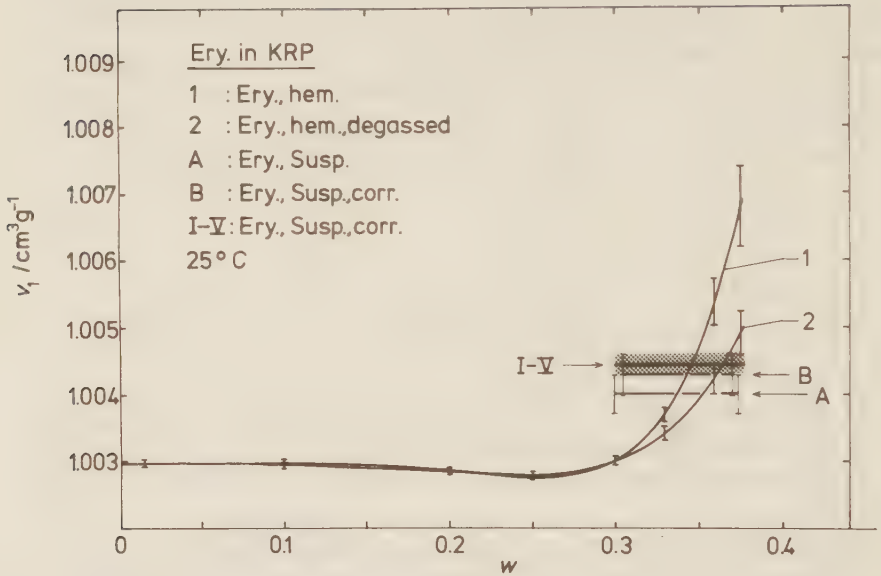


Abb. 10: Das partielle spezifische Volumen v_1 des Wassers als Funktion von w . Die Kurven 1 und 2 ergeben sich aus den Messungen an Hämolysaten (Abb. 9 und Tab. 4); die Geradenstücke A und B ergeben sich aus den Messungen an Erythrozytensuspensionen (s. Abb. 7 und Tab. 2); der schraffierte Bereich ergibt sich nach Auswertung der Datengruppen I - V, die aus allen Messungen an Erythrozytensuspensionen resultierten. Die Fehlerbalken entsprechen den Restfehlern in v_1 .

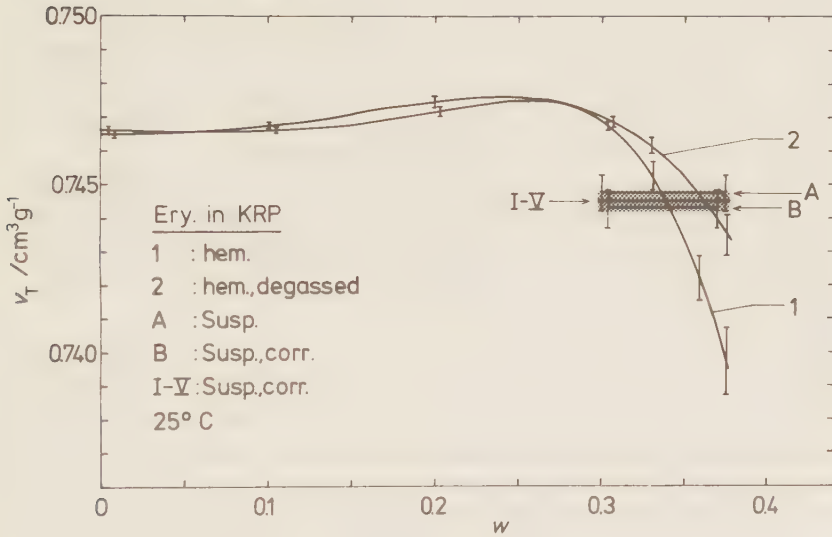


Abb. 11: Das partielle spezifische Volumen v_T der "Trockenkomponente" als Funktion von w . Die Bezeichnungen sind wie bei Abb. 10. Die Fehlerbalken entsprechen den Restfehlern in v_T .

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1 Wasser-Hämoglobin-Natriumchlorid-Mischungen

Das partielle spezifische Volumen von Proteinen zeigt eine schwache Abhängigkeit vom Massenbruch w an Protein in der wässrigen Mischung. Für eine Mischung mit 30 Gewichtsprozent Hämoglobin ist das partielle spezifische Volumen etwa 1% kleiner als in einer sehr verdünnten Lösung. Für wässrige Mischungen von Rinderserumalbumin ist die Konzentrationsabhängigkeit etwa zehnmal grösser als für Hämoglobinlösungen⁷, aber sie ist immer noch sehr klein, auch für sehr visköse Protein-Wasser-Mischungen.

Der Haupteinfluss des Salzes besteht in der signifikanten Änderung des Wertes für den Koeffizienten β_1 (vgl. Tab. 1) und damit auf die Änderung des partiellen spezifischen Volumens v_T^∞ der Trockenkomponente in der Mischung, extrapoliert nach unendlich verdünnten Lösungen.

Für die hier betrachtete Mischung aus 3 Komponenten geht Gl. 5 über in

$$(13) \quad v_T = v_{23} = (1-\alpha_3) v_2 + \alpha_3 v_3 .$$

Für kleine Werte von w ($w < 0.1$, s. Abb. 6) ergibt sich mit Gl. 12, $v_T^\infty = \beta_0 + \beta_1$, daher

$$(14) \quad \beta_1 = (1-\alpha_3) v_2 + \alpha_3 v_3 - v_1^0 ,$$

wobei v_1^0 das spezifische Volumen des reinen Wassers ist. Da in den Abbildungen 1 bis 5 die Grösse $\Delta v = v - \beta_0 - \beta_1 w = \beta_{k,w} + \beta_1 w^1$ als Funktion des Massenbruchs w dargestellt ist, ist dieser Salzeffekt auf β_1 garnicht zu sehen. Es ist nur der Effekt des Salzes auf die höheren Terme der Potenzreihe zu sehen. Hier zeigt die Funktion Δv charakteristische Züge sowohl von reinen Hb-Mischungen als auch von reinen NaCl-Lösungen (Abb. 4). Insbesondere für die beiden höheren Werte von α ergeben sich "biphasische" Kurven (s. Abb. 3). Das Superpositionsprinzip im strengen Sinn kann jedoch nicht angewandt werden, da die Funktion $v(w)$ nichtlinear ist.

Die negativen Werte für Δv , die für hohe Proteinkonzentrationen gefunden werden, können aus der Wechselwirkung der hydratisierten Proteinmoleküle untereinander erklärt werden.⁷

Infolge der Brown'schen Molekularbewegung lässt sich für jede Proteinkonzentration eine gewisse Wahrscheinlichkeit angeben, mit der die hydratisierten Proteinmoleküle für kurze Zeit Dimere oder Aggregate höherer Ordnung bilden können. Während dieses Prozesses kann eine Wechselwirkung zwischen den Hydrationssschalen untereinander und mit dem umgebenden Wasser auftreten. Eine Änderung der Eigenschaften - z.B. des spezifischen Volumens - eines gewissen kleinen Wasserbereiches in der Hydrationssschale oder in der Umgebung könnte die Folge sein.

Es werden zwei verschiedene Modelle beschrieben, für die quantitative Rechnungen durchgeführt wurden, die im Anhang 6.5 ausführlich dargestellt werden. Die Ergebnisse dieser Rechnungen lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Überlappungsmodell. Die Proteinmoleküle werden als feste Kugeln betrachtet, die von einer oder mehreren Schalen "locker gebundenen" Wassers umgeben sind. Während des Stössprozesses von zwei oder mehr Kugeln kommt es zu "Überlappungen" der "locker gebundenen" Schalen, wobei aus Platzgründen das Überlappungsvolumen in das "freie" Wasser übergeht und dabei seine Eigenschaften ändert. Um die negative Abweichung des spezifischen Volumens von einer linearen v -Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu erklären, muss man annehmen, dass das spezifische Volumen des "locker gebundenen" Wassers größer ist als das des "freien" Wassers. Die Modellrechnungen ergeben, dass die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen besteht, wenn man für den "harten" Kern der Kugel einen Radius von 3,15 nm annimmt (s. Abb. 20). Dieser Radius entspricht dem eines Hämoglobinmoleküls mit einer einzigen Schale fest gebundenem Wasser, wie im Anhang gezeigt wird. Die Kurvenformen, die sich aus den Modellrechnungen ergeben, variieren sehr stark mit dem Radius für den "festen" Kern. Das eröffnet umgekehrt die Möglichkeit, durch Volumenmessungen hochkonzentrierter Proteinlösungen die Durchmesser von unbekannten (kugelförmigen) Molekülen zu bestimmen.

Ober die Dicke der "locker" gebundenen Wasserschichten sind aus den Modellrechnungen keine Aussagen möglich, jedoch hängt der Wert des spezifischen Volumens dieses "locker" gebundenen Wassers sehr stark von dieser Schichtdicke ab. Nimmt man für das hydratisierte Hb-Molekül einen Radius von 3,15 nm an, so hätte eine einzige weitere Schicht "locker" gebundenes Wasser das spezifische Volumen $v_{1b} = 1,068 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (bei 25°C, s. Abb. 20, geschätzte Unsicherheit aus Gründen der Normierung, s. Abb. 21 : $0,02 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$); dieser Wert ist 6.5% grösser als der des "freien" Wassers. Für zwei weitere Schichten ergibt sich ein spezifisches Volumen von $1,010 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (geschätzte Unsicherheit $0,002 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), 0,7% grösser als der Wert für "freies" Wasser.

Kooperatives Modell. Bei diesem Modell wird angenommen, dass von den Proteinen während des "Stossprozesses" eine kooperative Wirkung auf eine gemeinsame Umgebung des "freien" Wassers ausserhalb der festen Hydratationsschalen ausgeht. Dieser Prozess mag zu Brücken⁵² führen, wobei das spezifische Volumen des "freien" Wassers in diesem Bereich geändert wird. In diesem Modell muss man annehmen, dass das spezifische Volumen des Wassers in der kooperativen Zone kleiner ist als das des "freien" Wassers.

Bei den Modellrechnungen muss dieser "kooperative" Bereich festgelegt werden, dazu ist ein weiterer Parameter notwendig, der die Ergebnisse dieses Modells etwas unsicherer macht. Für die Kurvenformen gelten die gleichen Überlegungen wie für das Überlappungsmodell. Bei bestimmten Annahmen für den kooperativen Bereich (s. Abb. 16) und $\gamma=1/2$ ergibt sich (wenn man für den Radius des hydratisierten Moleküls wieder 3,15 nm setzt und annimmt, dass der kooperative Bereich dann gebildet wird, wenn der Abstand der Zentren zweier Moleküle kleiner als 6,9 nm ist) ein Wert für $v_{1b} = 0,989 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (1,4% kleiner als "freies" Wasser). Obwohl bei diesem Modell keine Aussagen über das spezifische Volumen der "festen" Hydratationsschale möglich sind, wird man ein entsprechendes Ergebnis für die Hydratationsschale erwarten, d.h. dass dieses stark "gebundene" Wasser (wenn das kooperative Modell richtige ist) dichter ist als das "freie" Wasser.

Es ist z.Z. nicht möglich, aus den vorliegenden Volumenmessungen

Aussagen darüber zu machen, welches Modell richtiger ist. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, z.B. bei anderen Temperaturen, bei anderen Molekülgrößen, über den Einfluss von Salzen auf die Protein-Protein-Wechselwirkung bei hohen Konzentrationen etc. Erstaunlich ist, dass die sehr einfachen Modelle bei vernünftigen Annahmen die richtigen Kurvenformen liefern. Die Angaben über die Werte für das spezifische Volumen des "locker" gebundenen Wassers sind natürlich nur als Orientierungshilfen zu betrachten, denn die Kugelmodelle liefern auch dann die gleichen Kurvenformen, wenn sich die Bereiche der Wechselwirkungen nicht über die ganze Kugeloberfläche, sondern nur über einen Teil erstrecken. Das kommt der Realität etwas näher, da man für die Proteinoberfläche verschiedene Bereiche annehmen muss, die verschieden mit dem Wasser in Verbindung treten. Dann aber ändern sich die Zahlenwerte, die man für v_{1b} annehmen muss.

Ein negativer Wert für Δv , wie er für hohe Proteinkonzentrationen gefunden wird, könnte auch das Ergebnis einer Protonendissoziation aus Imidazol- oder anderen Gruppen des Proteins sein. Kauzmann³⁹ hat die Änderung des partiellen molaren Volumens als Ergebnis der Dissoziation von Imidazol- H^+ in Proteinen untersucht. Wenn dieser Effekt für die negativen Δv -Werte verantwortlich ist, müsste eine Volumenänderung von $5 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ erklärt werden, denn um diesen Betrag ist das partielle spezifische Volumen von Hämoglobin bei $w=0,45$ kleiner als v_{23}^∞ (s. Abb. 6). Pauly⁸ hat, basierend auf den Daten von Kauzmann, abgeschätzt, dass 15 bis 20 Protonen von jedem Hb-Molekül abdissoziieren müssen, um den beobachteten Effekt zu erreichen. Eine Dissoziation von diesem Ausmass hätte eine drastische Änderung des pH-Wertes in der Mischung zur Folge. Das ist nicht der Fall, da sich der pH-Wert einer isoionischen salzfreien Hb-Lösung nicht mit der Proteinkonzentration ändert, und der pH-Wert von konzentrierten Hb-Mischungen nach Zugabe von NaCl sich nur von 7,10 auf 7,28 erhöht. Aus den sauren und basischen Gruppen kann man für jedes Hb-Molekül eine durchschnittliche Nettoladung von 10^{-4} oder weniger Elementarladungen berechnen, die Nettoladung ist praktisch Null.

Der beobachtete negative Wert für Δv sollte deshalb auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen sein, die bei den hohen Proteinkonzentrationen stattfinden müssen.

5.2 Partielles spezifisches Volumen von Oxyhämoglobin und von Methämoglobin

Für salzfreie Hämoglobinlösungen wurde für das partielle spezifische Volumen von Hb, extrapoliert nach unendlicher Verdünnung, ein Wert von $v_2^{\infty} = 0,75313 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei 25°C mit einer Unsicherheit von $4 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ gefunden. Dieser Wert ist um etwa 2% niedriger als früher gefunden⁷. Der signifikante Unterschied resultiert aus der verbesserten Methodik für die Bestimmung des Massengehalts w der "Trockenmasse", die zu einem weiteren Wasserentzug von etwa 8% gegenüber früher geführt hat.

Das Problem des ziemlich fest gebundenen Wassers auf und in Proteinmolekülen sowie das Problem des "wahren" Wassergehalts getrockneter Proteine ist noch nicht ganz gelöst. Für Trypsin-Kristalle werden pro Molekül 20 - 25 H_2O -Moleküle angegeben^{11,12,35}, die innerhalb des Moleküls fest gebunden sind und offensichtlich eine wesentliche Rolle für die native Struktur des Moleküls spielen. Etwa die gleiche Anzahl von H_2O -Molekülen wird für Trypsin angegeben, die sich an der Oberfläche des Moleküls befinden. Allerdings sind noch keine anderen Proteine ausser Trypsin bekannt, wo so viele H_2O -Moleküle lokalisiert werden konnten. Für Hämoglobin liegen kaum Daten vor. Perutz⁵⁸ gibt 2 H_2O -Moleküle an, je 1 in den α -Ketten des Moleküls.

Es muss aber davon ausgegangen werden, dass H_2O -Moleküle, die fest innerhalb des Moleküls gebunden sind, überhaupt nicht, und die an der Oberfläche des Moleküls gebundenen nur zu einem Teil durch das Trocknungsverfahren entfernt werden. Daher kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass andere Autoren bessere Trocknungsverfahren finden, die dann zu etwas kleinere Werte für v_2^{∞} führen. Die hier angegebenen Werte sind aber reproduzierbar innerhalb der kleinen angegebenen Unsicherheit.

Für das partielle spezifische Volumen von Methämoglobin (Mb) vom Rind wurde, extrapoliert nach unendlicher Verdünnung, ein Wert von $v_{\text{Mb}}^{\infty} = 0,7541 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei 25°C mit einer Unsicherheit von $2 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ gefunden. Dieser Wert liegt zwischen dem von

$v_{\text{Mb}}^{\infty} = 0,7583 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, der von Bull und Breese¹⁷ gefunden wurde, und dem von $v_{\text{Mb}}^{\infty} = 0,7503 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, der von Behlke und Wandt⁴ angegeben wurde. Das Hämoglobin, welches bei den hier beschriebenen Untersuchungen verwendet wurde, enthielt zwischen 6 und 10% Methämoglobin. Mit dem oben angegebenen Wert für v_{Mb}^{∞} ergibt sich damit für "reines" Oxyhämoglobin vom Rind ein Wert von $v_{\text{Hb}}^{\infty} = 0,75305 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei 25°C mit einer Unsicherheit von $5 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

5.3 Natriumchloridlösungen

Aus den Dichtemessungen an reinen Natriumchloridlösungen (s. Abb. 4, Tab. 1) ergab sich für das partielle spezifische Volumen von NaCl, extrapoliert nach unendlich verdünnten Lösungen, ein Wert von $v_3^{\infty} = 0,2865 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei 25°C mit einer Unsicherheit von $3 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ oder ein partielles molares Volumen $V_3^{\infty} = 16,74 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Dabei wurde NaCl Suprapur von Merck verwendet, welches von den kommerziell erhältlichen Präparaten das mit dem höchsten Reinheitsgrad ist.

Die Werte für das partielle molare Volumen von NaCl in unendlich verdünnten Lösungen, die bisher veröffentlicht wurden (Wirth und Bangert⁸¹, Millero⁴⁸ und dessen Literaturangaben), liegen in einem Bereich zwischen 16,61 und 16,67 $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ bei 25°C. Der hier angegebene Wert liegt etwa 6% höher als der Mittelwert der bisher publizierten Daten. Dieser signifikante Unterschied ist möglicherweise durch die einfache Extrapolation aus der angepassten Funktion $v(w)$ zu erklären, bei der nur die Koeffizienten $\beta_{3/2}$ und β_1 für die Anpassung in einem w -Bereich bis zu $w = 0,024$ (entsprechend 0,421 mol NaCl/kg H_2O) verwendet wurden.

Da der Beitrag des Salzes zum partiellen spezifischen Volumen v_{23}^{∞} der Trockenkomponente klein ist (s. Gl. 5), entspricht ein Unterschied von 6% in den Werten für v_3^{∞} einer systematischen Abweichung in v_{23}^{∞} von $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei $\alpha_3 = 0,02133$. Die Unterschiede zwischen den Werten verschiedener Autoren sind zu klein, um einen Einfluss auf die Schlussfolgerungen zu haben, die aus den Ergebnissen der Dichtemessungen an Salz-Hämoglobin-Mischungen gezogen wurden.

5.4 NaCl-Hb-Wechselwirkung in verdünnten Lösungen

Abbildung 6 zeigt, dass bis zu einem Massengehalt $w = 0,1$ für alle verwendeten Salzkonzentrationen v_{23} von v_{23}^{∞} um weniger als $10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ abweicht. $w = 0,1$ entspricht einer Hämoglobinkonzentration von $1,72 \text{ mmol Hb pro Kg Wasser}$. Dieser lineare Bereich kann praktisch zum Bereich des "Grenzgesetzes unendlicher Verdünnung", $w \rightarrow 0$, hinzugenommen werden.

Aus Gl. 13 folgt, dass v_{23}^{∞} eine lineare Funktion von α_3 bzw. α ist, $v_{23}^{\infty} = v_2 + (v_3 - v_2)\alpha$, da angenommen werden kann, dass v_2 und v_3 im Grenzfall $w \rightarrow 0$ konstant sind. Abbildung 12 zeigt, dass die experimentellen Werte v_{23}^{∞} eine lineare Funktion von α sind.

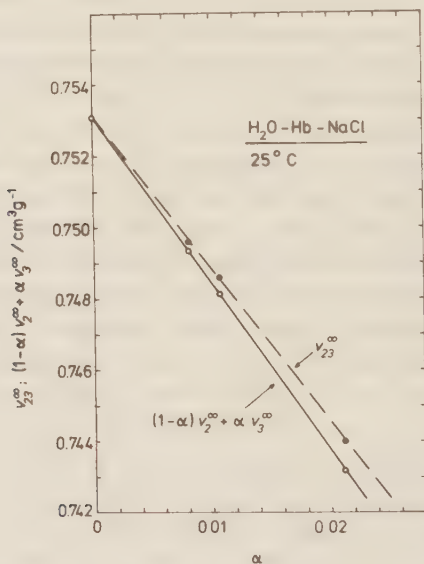


Abb. 12: Experimentelle Grenzwerte v_{23}^{∞} für die "Trockenkomponente" in H₂O-Hb-NaCl-Mischungen, sowie berechnete Grenzwerte $[(1-\alpha)v_2^{\infty} + \alpha v_3^{\infty}]$ als Funktion von α . Die Fehler sind kleiner als $7 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ - s. Tab. 5 - und nicht grösser als die Symbole der Messpunkte in der Abbildung.

Die experimentell durch Extrapolation nach unendlich verdünnten Lösungen erhaltenen Werte v_{23}^{∞} lassen sich mit den aus Gl. 15 berechneten Werten $v_{23}^{\infty t}$ vergleichen,

$$(15) \quad v_{23}^{\infty t} = (1-\alpha) v_2^{\infty} + \alpha v_3^{\infty},$$

wobei v_2^{∞} das partielle spezifische Volumen von Hb in der reinen Hb-Lösung ist ($\alpha=0$, Abb. 1, Tab. 1), extrapoliert nach unendlicher Verdünnung, und v_3^{∞} das partielle spezifische Volumen von NaCl in der reinen NaCl-Lösung ist ($\alpha=1$, Abb. 4, Tab. 1), ebenfalls extrapoliert nach unendlicher Verdünnung. Dabei ist angenommen, dass in dem Bereich $0 < w < 0,1$ zwischen Hb und den Salzionen keine Wechselwirkungen auftreten. Das Ergebnis dieser Rechnung ist in Abb. 12 gezeigt sowie in den Spalten 2 und 3 von Tabelle 5.

Tab. 5: Experimentelle Grenzwerte v_{23}^{∞} der "Trockenkomponente" in H_2O -Hb-NaCl-Mischungen sowie berechnete Grenzwerte $v_{23}^{\infty t}$ für verschiedene Werte von α . Die Zahlen unter den letzten Ziffern der Werte sind Restfehler (s. Anhang 6.1).

α	$\frac{v_{23}^{\infty}}{cm^3 g^{-1}}$	$\frac{v_{23}^{\infty t}}{cm^3 g^{-1}}$	$\frac{v_{23}^{\infty} - v_{23}^{\infty t}}{10^{-4} cm^3 g^{-1}}$
0	0,75313 ₄	0,75313 ₄	0
0,00810 ₁	0,74960 ₇	0,74935 ₄	2,5 ₈
0,01072 ₁	0,74860 ₅	0,74813 ₄	4,7 ₇
0,02133 ₁	0,74394 ₅	0,74318 ₄	7,6 ₇

Für $\alpha = 0$ sind die gemessenen Werte v_{23}^{∞} signifikant grösser als die berechneten Werte $v_{23}^{\infty t}$. Die Differenz ist etwa 10mal grösser als die experimentellen Fehler (s. Tab. 5). Die Differenz nimmt mit α zu und deutet auf eine Salz-Protein-Wechselwirkung hin.

Eine Salz-Protein-Wechselwirkung, die zu einem grösseren Wert von v_{23}^{∞} im Vergleich zu $v_{23}^{\infty t}$ führt, könnte durch Bindung von positiven oder negativen Ionen an das Protein zustandekommen. Eine Expansion erfolgt, wenn ein Ion aus der Lösung entfernt wird. Dabei wird sich das durch Elektrostriktion komprimierte Wasser ausdehnen, da das elektrische Feld des Ions verschwunden ist. Ein zweiter Beitrag zur Volumenänderung kann durch die Bindung eines Ions an das Proteinmolekül entstehen. Falls es bei dieser Bindung zu einer Elektrostriktion des Wassers innerhalb des "gebundenen" Wassers kommt, die etwa genauso gross ist wie im normalen Wasser, dann werden sich beide Volumenbeiträge nahezu aufheben, und die gemessene Volumenänderung wird nahezu Null sein. Ein anderer Beitrag zur Volumenänderung kann durch eine allosterische Volumenänderung des Proteinmoleküls, verursacht durch die Ionenbindung, zustandekommen. Im allgemeinen kann die Nettoänderung des Volumens positiv oder negativ sein, je nach der Grösse der drei verschiedenen Beiträge.

Rasper und Kauzmann⁶³ haben gezeigt, dass die Bindung von Protonen zu positiven und ziemlich grossen Änderungen des partiellen molaren Volumens führt (10 bis 20 cm³ mol⁻¹, je nach Reaktion). Pauly⁸ konnte aber berechnen, dass im Fall von Hb-NaCl-Lösungen keine Protonenbindungen auftreten können, da sich der pH-Wert der Lösungen nach Salzzugabe nur innerhalb von 7,10 und 7,28 ändert.

Volumeneffekte durch Wechselwirkung des Proteins mit anderen Ionen als Protonen sind nicht so extensiv untersucht worden. Katz et al.³⁸ haben gefunden, dass eine Bindung von Trichloracetationen an Rinderserumalbumin von einer Volumenvergrösserung begleitet ist, während die Bindung von Thiocyanationen sowohl zu einer Abnahme als auch zu einer Zunahme des Volumens führen kann, je nach der verwendeten Konzentration des Ions.

Bindung von Natrium- oder Chloridionen an isoionisches Hämoglobin könnte der Grund für einen positiven Wert der Differenz $v_{23}^{\infty} - v_{23}^{\infty t}$ sein. Eine Bindung von Natrium kann ausgeschlossen werden, da experimentell kein Hinweis einer Bindung an isoionisches Hämoglobin vom Rind, Mensch, Pferd und Hund gefunden wurde²⁰. Sogar Serumalbumin, bekannt wegen starker Anionenbindung, bindet weder Kalium- noch Natriumionen⁶⁸.

Dagegen ist bekannt, dass Proteine einwertige Anionen binden. Die Anzahl der Bindungsstellen und die Werte für die Bindungskonstanten hängen von der Ionensorte und auch von der Art des Proteins ab^{19,69,70}. Besonders gut untersucht ist die Bindung von Anionen an Serumalbumin⁶⁸⁻⁷⁰. Carr¹⁹ untersuchte die Anionenbindung an Hämoglobin an dessen isoelektrischen Punkt bis pH 6,8 in Lösungen mit 3,6 Gewichtsprozent Hb und 17 mmol Chloridionen pro Liter Lösung und fand keinen Hinweis auf eine Bindung.

Potentiometrische Bestimmungen⁵⁹ des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in Hämoglobinlösungen weisen jedoch auf eine schwache Bindung von Chloridionen an Hämoglobin hin⁷⁷. Bei diesen Messungen wurden Hb-NaCl-Mischungen mit Konzentrationen bis zu 0,5 mol NaCl pro kg Wasser und 575g Rinderhämoglobin pro kg Wasser untersucht, und die pH-Verschiebung von pH 7,10 bis pH 7,35 nach Zusatz von NaCl zu den isoionischen Hb-Lösungen analysiert. Bei dieser Analyse wurde von Scatchard's Beziehung zwischen pH-Verschiebung und Anzahl der gebundenen Ionen Gebrauch gemacht. Es scheinen 30 - 40 Bindungsstellen mit einer ziemlich kleinen "intrinsischen" Gleichgewichtskonstanten von etwa 5 kg mol^{-1} vorzuliegen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Mischungen sollten bis zu 4 Chloridionen an ein Hb-Molekül gebunden sein, was zu einem Anstieg des partiellen spezifischen Volumens v_{23}^{∞} der "Trockenkomponente" führt. Eine erste rohe Abschätzung führt zu der richtigen Größenordnung von $v_{23}^{\infty} - v_{23}^{\infty t}$.

5.5 Erythrozytensuspensionen und Hämolysate

Bei der Dichtemessung von Suspensionen mit der Biegeschwinger-methode können falsche Werte gemessen werden, wenn die Teilchengrösse einen gewissen Wert überschreitet. In Anhang 6.3 wird berechnet, bei welchen Grössen die Teilchen der mechanischen Bewegung des Schwingers nicht mehr folgen können. Bei Radien grösser als etwa $30\text{ }\mu\text{m}$ ist eine Beeinflussung der Dichtemessung zu erwarten.

Ferner unterliegen die Teilchen der Suspension einer Sedimentation durch Schwerkräfte und Zentrifugalkräfte. In Anhang 6.3 wird gezeigt, dass Zentrifugalkräfte zu vernachlässigen sind, dass es aber zu einer Sedimentation durch das Schwerfeld kommt, die zu einer ungleichen Massenbelegung im Biegeschwinger führt (Blutsenkung im U-Rohr des Biegeschwingers). Das führt zu einer messbaren Veränderung der Eigenfrequenz des Schwingers und damit zu einer Verfälschung des gemessenen Dichtewertes. Eine korrekte Messung ist nur bei dichtgepackten Sedimenten möglich.

Bei gepackten Sedimenten ist die exakte Bestimmung des Packungsanteils schwierig. Das vorhandene Zwischenzellvolumen beeinflusst sowohl die Werte für das spezifische Volumen der Erythrozyten, als auch die Werte für den Massengehalt. Der Messung leicht zugänglich ist der Hämatokritwert der gepackten Sedimente. Die Hämatokritwerte lagen zwischen 0,985 und 1, wobei geschrumpfte Erythrozyten die höheren Hämatokritwerte zeigen. Der Einfluss des Zwischenzellvolumens kann durch Anwendung von Korrekturformeln (Gl. 36 und Gl. 41 in Anhang 6.4) berücksichtigt werden. Setzt man die gemessenen Hämatokritwerte in diese Gleichungen ein, so ergibt sich eine negative Verschiebung der v -Werte bis zu etwa $1 \times 10^{-3}\text{ cm}^3\text{ g}^{-1}$ (0,1%), und eine positive Verschiebung der Werte w bis zu etwa 5×10^{-3} (1%). Diese im Vergleich zur Messgenauigkeit relativ grossen Verschiebungen verlaufen jedoch annähernd parallel zur $v(w)$ -Kurve. Wie der Vergleich mit Abbildung 7 und auch ein F-Test zeigen (Testverfahren s. Anhang 6.1), unterscheiden sich beide Datengruppen nicht signifikant voneinander. Das ist allerdings deshalb so, weil ein F-Test aus der Varianzanalyse der Prüfung gleicher Mittelwerte angewandt wurde, d.h., in diesem Fall

wurde eigentlich die Gleichheit der Grössen β_0 und $(\beta_0 + \beta_1)$ geprüft. Wie der Vergleich der Datengruppen A und B in den Abbildungen 10 und 11 sowie in Tabelle 2 zeigt, sind die Werte für das partielle spezifische Volumen nicht signifikant verschieden, obwohl die Einzelwerte von v und w der beiden Gruppen sich signifikant voneinander unterscheiden. Selbst wenn für alle Zellsuspensionen, die für die Messpunkte in Abbildung 7 und Tabelle 2 verwendet wurden, ein Zwischenzellvolumen von 5% angenommen wird, unterscheiden sich die Werte von β_0 und $(\beta_0 + \beta_1)$ nicht signifikant voneinander (s. Anhang 6.42).

Diese Überlegungen werden allerdings dadurch begünstigt, dass alle Messreihen an Erythrozytensuspensionen durch lineare Anpassungen approximiert werden können, höhere Glieder einer Potenzreihe (Gl. 6) bringen keine signifikante Verbesserung des Datenfits.

Zusammenfassend zeigen diese Überlegungen, dass Zwischenzellvolumen von bis zu 5% bei Erythrozytensuspensionen keine Rolle spielen, solange man sich nur für die Werte des partiellen spezifischen Volumens interessiert.

Die Messpunkte aller Messreihen an Erythrozytensuspensionen lassen sich nicht zu einer Gruppe zusammenfassen; es zeigt sich, dass bei der vorliegenden Genauigkeit sich einige Messreihen signifikant voneinander unterscheiden. Insgesamt lassen sich 5 Gruppen bilden (s. Abb. 8 und Tab. 3). Die Gründe für diese Verschiedenheit sind unklar, sie können möglicherweise durch eine Analyse der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Zellgruppen aufgeklärt werden.

Aus den 5 Gruppen ergibt sich (für die nach Gl. 36 und 41 korrigierten Messdaten) für das partielle spezifische Volumen des Wassers in Erythrozyten ein Wert von $v_1 = 1,00445 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ mit einer Unsicherheit von $0,00017 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (0,02%; vergl. Abb. 10 und Tab. 3). Für das partielle spezifische Volumen der "Trockenkomponente" ergibt sich ein Wert von $v_T = 0,7445 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ mit einer Unsicherheit von $0,0004 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (0,05%; vergl. Abb. 11 und Tab. 3).

Diese Werte können mit Daten verglichen werden, die aus Hämolysaten gewonnen wurden. Da einzelne Messreihen sich signifikant unterscheiden, ist der Vergleich an einer typischen Messreihe durchgeführt worden. Dabei stellte sich heraus, dass entgaste und nicht-entgaste Proben der Hämolysate für höhere Konzentrationen unterschiedliche Ergebnisse liefern (vergl. Abb. 9 - 11). Das partielle spezifische Volumen von Wasser in nicht-entgasten Proben ist für $w > 0,33$ signifikant grösser als das der entgasten Proben (s. Abb. 10). Das partielle spezifische Volumen der Trockenkomponente ist andererseits bei den entgasten Proben für $w > 0,33$ grösser als das der nicht-entgasten Proben. Der Effekt soll hier nur registriert werden, er wurde wegen der Verschiedenheit der Messreihen an Rindererythrozyten nicht weiter untersucht, er soll jedoch noch bei adulten Humanerythrozyten studiert werden.

Der Vergleich der Messpunkte von Hämolysaten und Erythrozytensuspensionen (s. Abb. 9) zeigt in dem Bereich von $w = 0,3$ bis $w = 0,37$ eine Übereinstimmung. Bei den partiellen Grössen (Abb. 10 und 11) ist die Übereinstimmung nicht so gut zu sehen. Nimmt man jedoch nur Messpunkte der Hämolysate zwischen $w = 0,30$ und $w = 0,37$ und approximiert sie durch eine Gerade, so ist die Übereinstimmung gut (keine Abbildung). Eine besondere Struktur des Wassers in den Zellen im Vergleich zu den gleich zusammengesetzten Hämolysaten ist nicht erkennbar.

Bei Vergleichen des partiellen spezifischen Volumens der Trockenkomponenten zwischen den Messungen an Erythrozyten und Hämolysaten einerseits und Messungen an Hb-NaCl-Mischungen andererseits müssen die unterschiedlichen Zusammensetzungen berücksichtigt werden. Für das partielle spezifische Volumen v_T^∞ der Trockenkomponente von Hämolysaten, extrapoliert nach unendlicher Verdünnung, ergibt sich - vergl. Tabelle 4, systematische Verschiebung bei β_0 berücksichtigt - ein Wert von $v_T^\infty = 0,74655 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ mit einer Unsicherheit von $8 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

Dieser Wert kann verglichen werden mit dem nach Gl. 5 berechneten Wert. Dazu wird die Zusammensetzung der Trockenmasse der Erythrozyten benötigt. In Tabelle 5a sind Daten aus biologischen Handbüchern angegeben. Für die wichtigsten Ionen Kalium, Natrium

und Chlorid liegen auch eigene Messwerte vor: es ist $\alpha=0,0166$; zusammen mit anderen Ionen mag sich ein Wert von $\alpha=0,020$ ergeben. Die Werte für v_j für Lipide und für das übrige organische Material sind mit grosser Unsicherheit behaftet. Hier können Experimente mit Ghostzellen von Erythrozyten, verbunden mit Analysen der chemischen Zusammensetzung, die fehlenden Daten liefern. Für das berechnete partielle spezifische Volumen der Trockenkomponente ergibt sich ein Wert von $0,7474 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, der allerdings mit einer grossen Unsicherheit behaftet ist. Auf eine detailliertere Diskussion - z.B. auf den Einfluss der Salzbindung an Hb - soll deshalb nicht eingegangen werden.

Tab. 5a: Daten über die Zusammensetzung der Trockenmasse von Erythrozyten sowie Angaben über die verwendeten Werte der partiellen spezifischen Volumen. α_j ist in g pro g Trockenmasse angegeben; die eingeklammerten Werte sind unsicher.

Komponente	α_j	$v_j/\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$\alpha_j v_j/\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	Bemerkungen
Hämoglobin	0,94	0,753	0,7078	v_{Hb} aus dieser Arbeit
Salze	0,020	0,288	0,0058	$v_j=v_{\text{NaCl}}$ aus dieser Arbeit
Lipide	0,015	(1)	(0,0150)	v_j unbekannt
andere Proteine u. organ. Material	0,025	(0,75)	(0,0188)	v_j unsicher
Summe	1		0,7474	

Eine wichtige Voraussetzung der Dichtemessungen an Erythrozytensuspensionen ist die, dass bei den osmotischen Veränderungen nur Wassertransporte stattfinden, jedoch keine Salztransporte auftreten dürfen. Die thermodynamische Analyse verlangt, dass das Verhältnis der Komponenten in der Trockenmasse (Gl. 3) konstant ist.

Diese Voraussetzungen wurden geprüft durch Bestimmungen der Konzentrationen der wichtigsten Ionen Natrium, Kalium und Chlorid in verschiedenen Proben der Trockenmasse. Für den gesamten Bereich der vorkommenden w-Werte zwischen $w=0,30$ und $w=0,37$ ergibt sich (Angaben in g pro g Trockenmasse, die Daten sind korrigiert bzgl. des gemessenen Hämatokritwertes):

$$\alpha_{\text{Na}} = 0,0058 \pm 1,5\%, \text{ Zunahme von } 3\% \text{ zwischen } w=0,3 \text{ und } w=0,37;$$

$$\alpha_{\text{K}} = 0,0021 \pm 3\%, \text{ keine Änderung zwischen } w=0,3 \text{ und } w=0,37;$$

$$\alpha_{\text{Cl}} = 0,0086 \pm 1,5\%, \text{ für } w=0,335; \text{ Zunahme von } 3\% \text{ zwischen } w=0,335 \text{ und } w=0,3 \text{ sowie zwischen } w=0,335 \text{ und } w=0,37.$$

Mit den Daten aus Tabelle 5a und Gl. 5 kann man überprüfen, wie sich eine Erhöhung des Salzgehaltes um 3% auf das partielle spezifische Volumen der Trockenkomponente auswirkt. Nimmt man für die übrigen Komponenten die gleichen Massenverhältnisse untereinander an, so bewirken 3% Salzzunahme eine Abnahme von v_T um $2,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Der Vergleich mit Abbildung 11 zeigt, dass dieser Wert noch innerhalb der Fehlerbalken liegt, diese geringe Salzverschiebung hat also keinen Einfluss auf die Schlussfolgerungen dieser Arbeit.

Beim Vergleich der Werte für das partielle spezifische Volumen v_1 des Wassers in Hämolysaten einerseits und in Wasser-Hämoglobin-Salzmischungen andererseits treten trotz eines ähnlichen biphasischen Verlaufes der Funktion $v_1(w)$ Unterschiede auf. Die Werte für v_1 sind in Hämolysaten für $w>0,3$ (Abb. 10) erhöht gegenüber den Werten für $w>0,3$ in $\text{H}_2\text{O-Hb-NaCl}$ -Mischungen (Abb. 5). Die Erhöhung beträgt bei $w=0,35$ etwa 0,07% bei den Hämolysaten und ebenso viel bei den Erythrozytensuspensionen (Messreihe A in Abb. 10) im Vergleich zu den $\text{H}_2\text{O-Hb-NaCl}$ -Mischungen mit $\alpha=0,02133$. Der Unterschied kann noch nicht sicher erklärt werden. Es ist möglich, dass hier Untersuchungen an Ghostzellen von Erythrozyten nützlich sind, obwohl man vermuten könnte, dass die Lipide infolge ihres kleinen Massenanteils nur wenig beitragen. Eine erste vorläufige Messung an Erythrozytenghostzellen ergibt jedoch eine Erhöhung des partiellen spezifischen Volumens des Wassers

($v_1 = 1,0041 \pm 0,0001 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), was auf eine besondere Struktur des an Lipiden "gebundenen" Wassers hinweist. Der Wert ist jedoch noch nicht gesichert.

Zusammenfassend lässt sich aber bisher sagen, dass die Erhöhung des partiellen spezifischen Volumens des Wassers in Erythrozyten (Tab. 3) um etwa 0,14% gegenüber dem Wert des normalen Wassers bei 25°C mit Sicherheit zu einem Drittel aus der Wechselwirkung von Hämoglobinmolekülen untereinander erklärt werden kann, wie es bereits bei $\text{H}_2\text{O-Hb-NaCl}$ -Mischungen geschah. Der Wert von $1,00445 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ist jedoch weit entfernt von Werten für das spezifische Volumen, das für verschiedene Eisstrukturen angegeben wird²⁶. Die Erhöhung von 0,14% entspricht einer Vergrößerung des spezifischen Volumens des normalen Wassers durch eine Temperaturerhöhung von 25° auf 30°C.

6. Anhang

6.1 Bestimmung der Koeffizienten β_i und der Restfehler; statistische Testverfahren

Für die mathematische Anpassung der Messpunkte wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewandt^{9,14}. Dabei wurden die Datenpunkte mit dem Faktor $1/\sigma_i^2$ bewichtet und der beste Datenfit - wie üblich - erhalten, indem die Funktion M,

$$(16) \quad M = \sum_{i=1}^N \frac{[v_i - v(w_i)]^2}{\sigma_i^2},$$

zu einem Minimum gemacht wurde; $v(w)$ ist dabei die Potenzreihe von Gl. 6. Die Gewichtungsfaktoren $1/\sigma_i^2$ hängen hauptsächlich von der Unsicherheit bei der Bestimmung der Trockenmasse ab. Da das spezifische Volumen v in erster Näherung linear von w abhängt, wurde σ_i aus Gl. 17 berechnet (die Abweichung von der Linearität ist kleiner als 0,1%):

$$(17) \quad \sigma_i = |\beta_1| s_{w_i}.$$

In Gl. 17 ist s_{w_i} die Standardabweichung bei der Bestimmung des Massengehalts w (s. Abb. 13).

Gl. 16 ergibt ein System linearer Gleichungen für die Koeffizienten β_i .

Als Beispiel für die Bestimmung des besten "Fits" wird das Anpassungsverfahren für die Messdaten der Messreihe mit $\alpha = 0.02133$ beschrieben. Zunächst wurde eine lineare Regression mit zwei Koeffizienten β_0 und β_1 versucht, dann Potenzreihen mit drei Koeffizienten β_0 , β_1 , β_k ($2 \leq k \leq 7$), und schliesslich Potenzreihen mit vier Koeffizienten β_0 , β_1 , β_k , β_l ($2 \leq k, 1 \leq l, 1 \neq k$). Tabelle 6 zeigt eine Auswahl dieser Versuche.

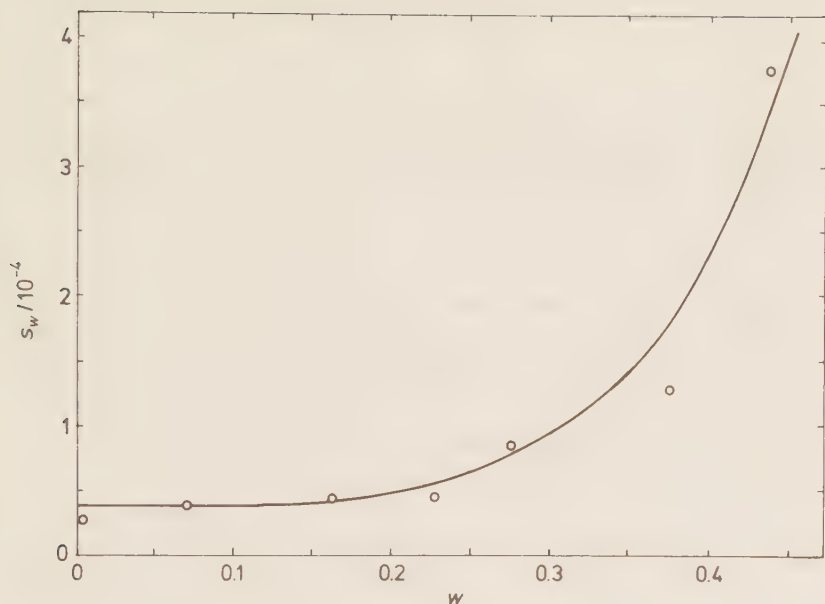


Abb. 13: Standardabweichung s_w bei der Bestimmung des Massen-
gehalts w der "Trockenmasse" von H_2O -Hb-NaCl-Mischungen.

Die letzte Spalte der Tabelle 6 zeigt die Werte für die Minimumfunktion M . Um die Güte der verschiedenen Anpassungen zu beurteilen, kann man die Werte für M mit den tabellierten Werten für eine χ^2 -Verteilung mit - in diesem Fall - 38 Freiheitsgraden vergleichen^{9,14}. Für die Potenzreihe $P_1(\beta_0, \beta_1, \beta_4, \beta_7)$ versagt der χ^2 -Test erst bei einem Signifikanzniveau von grösser als 0,2. Das bedeutet, dass die experimentellen Unsicherheiten einer Normalverteilung entsprechen und dass die gewählte Potenzreihe eine gute Anpassung ist.

Bei den Messreihen mit $\alpha=0$ und $\alpha=0,0810$ versagt der χ^2 -Test sogar bei einem Signifikanzniveau von 0,001. Es wird angenommen, dass dabei andere Fehler als die σ_i eine signifikante Rolle spielen.

Tab. 6: Auswahl von Koeffizienten β_i als Beispiel für das Anpassungsverfahren für die Messdaten aus der Messreihe mit H_2O -Hb-NaCl-Mischungen ($\alpha=0,02133$; $N=42$).

β_0 $\frac{cm^3}{g}$	β_1 $\frac{cm^3}{g}$	β_2 $\frac{cm^3}{g}$	β_3 $\frac{cm^3}{g}$	β_4 $\frac{cm^3}{g}$	β_5 $\frac{cm^3}{g}$	β_6 $\frac{cm^3}{g}$	β_7 $\frac{cm^3}{g}$	M
+ 1,002948	- 0,258822	0	0	0	0	0	0	191
+ 1,002931	- 0,258654	0	0	0	0	- 0,0351	0	119
+ 1,002932	- 0,258663	0	0	0	0	0	- 0,0883	109
+ 1,002975	- 0,259544	+ 0,00325	0	0	0	- 0,0843	0	74
+ 1,002972	- 0,259451	+ 0,00274	0	0	0	0	- 0,178	74
+ 1,002967	- 0,259195	0	+ 0,00837	0	0	- 0,118	0	77
+ 1,002964	- 0,259136	0	+ 0,00649	0	0	0	- 0,230	60
+ 1,002965	- 0,259130	0	0	+ 0,0579	- 0,142	0	0	65
+ 1,002962	- 0,259068	0	0	+ 0,0299	0	- 0,183	0	66
+ 1,002959	- 0,259022	0	0	+ 0,0202	0	0	- 0,311	44
+ 1,002958	- 0,258998	0	0	0	+ 0,149	- 0,372	0	58
+ 1,002956	- 0,258958	0	0	0	+ 0,0742	0	- 0,467	66
+ 1,002953	- 0,258915	0	0	0	0	+ 0,365	- 0,918	53

Um diese Messungen trotzdem verwenden zu können, sind alle Werte σ_i um den Faktor $\sqrt{M/N-1}$ vergrößert worden, entsprechend einem Vorschlag von Rosenfeld^{16,65}. In allen Tabellen und Abbildungen sind - falls überhaupt notwendig - diese Faktoren berücksichtigt worden.

Als nächster Schritt wurde ein geeigneter F-Test ausgeführt, um zu testen, ob ein zusätzlicher Term in der Potenzreihe eine signifikante Verbesserung der Anpassung bringt. Zum Vergleich der Potenzreihen $P_0 (\beta_0, \beta_1, \beta_7)$ und $P_1 (\beta_0, \beta_1, \beta_4, \beta_7)$ wird der Wert $F_x = v_1 (M_0 - M_1)/M_1$ berechnet, wobei v_1 die Anzahl der Freiheitsgrade ist. Dieser Wert wird mit den tabellierten Werten einer F-Verteilung mit $v_0=1$ und v_1 verglichen. In diesem Fall ist $F_x = 56,1$. Für ein Signifikanzniveau von 0,001 (statistische Sicherheit 99,9%) ist der tabellierte Wert (für $v_1=38$) $F=12,6$. Das bedeutet, dass die Verbesserung der Anpassung durch die Verwendung der Potenzreihe $P_1(\beta_0, \beta_1, \beta_4, \beta_7)$ hochsignifikant ist.

Für die Messreihen mit den anderen Werten für α haben die F-Tests folgendes ergeben:

für $\alpha = 0,01072$ ist die Potenzreihe mit vier Koeffizienten signifikant besser als die mit drei Koeffizienten. Für $\alpha = 0,00810$ ist die Potenzreihe mit 4 Koeffizienten wahrscheinlich besser als die beste mit 3 Koeffizienten. Für $\alpha = 0$ bringt eine Potenzreihe mit vier Koeffizienten keine Verbesserung der Anpassung.

Die Unsicherheiten in den Koeffizienten wurden auf üblichem Wege berechnet (s. unten). In Tabelle 1 sind diese Unsicherheiten unter den betreffenden Ziffern bei den Werten für die Koeffizienten angegeben.

Restfehler

Um die Unsicherheiten bei den angepassten Werten v für das spezifische Volumen und für die partiellen Größen v_1 und v_T anzugeben, wurden Restfehler auf folgende Weise berechnet¹⁴:

Es wurde die Kovarianzmatrix $\mathbf{G}^{-1}$ bestimmt,

$$(18) \quad \mathbf{G}^{-1} = \mathbf{A} \mathbf{G}_{\beta}^{-1} \mathbf{A}^T,$$

wobei $\mathbf{G}_{\beta}^{-1}$ die Kovarianzmatrix für die Koeffizienten β_i ist (die Wurzeln der Diagonalelemente sind die Unsicherhei-

ten der Koeffizienten), $\mathbf{A}$ ist eine Matrix von der Form, wie sie in den Gl. 19 - 21 explizit angegeben ist; $\mathbf{A}^T$ ist die transponierte Matrix $\mathbf{A}$. Die Reihe j der Matrix $\mathbf{A}$ hat eine der folgenden Formen, wenn eine Potenzreihe der Art $P(\beta_0, \beta_1, \beta_k)$ verwendet wird:

- a) für die Restfehler δv des spezifischen Volumens v für einen beliebigen Wert w_j :

$$(19) \quad \mathbf{a}_j = \begin{vmatrix} 1 & w_j & w_j^k \end{vmatrix},$$

- b) für die Restfehler δv_1 des partiellen spezifischen Volumens v_1 des Wassers für einen Wert w_j :

$$(20) \quad \mathbf{a}_j = \begin{vmatrix} 1 & 0 & (1-k)w_j^k \end{vmatrix},$$

- c) für die Restfehler δv_T des partiellen spezifischen Volumens v_T der Trockenmasse für einen Wert w_j :

$$(21) \quad \mathbf{a}_j = \begin{vmatrix} 1 & 1 & kw^{k-1} + (1-k)w^k \end{vmatrix}.$$

Die Quadratwurzel aus dem Element (jj) der Matrix $\mathbf{G}^{-1}$ ist der Restfehler der gesuchten Grösse für den Wert w_j . Die Fehlerbalancen, die in vielen Abbildungen angegeben sind, wurden nach Gl. 18 berechnet.

Varianzanalyse: Zusammenfassung von Datengruppen

Eine einfache Varianzanalyse¹⁴, die sich mit der Prüfung der Hypothese gleicher Mittelwerte mehrerer Stichproben beschäftigt, wurde erweitert für die Prüfung, ob verschiedene Datengruppen - hier erhalten aus den Messungen an Erythrozytensuspensionen - zusammengefasst werden dürfen.

Der Test geht so vor, dass die Quadratsummen (Minimumfunktion) zwischen den Untergruppen mit der Summe der Minimumfunktionen innerhalb der Untergruppen über einen F-Test verglichen werden.

Es seien t Untergruppen mit insgesamt N Messdaten gegeben.

Der eine Term für den Test ist die Summe der Minimumfunktionen innerhalb der t Untergruppen,

$$(22) \quad M_w = \sum_{i=1}^t M_i .$$

Der zweite Term ist die Quadratsumme (Minimumfunktion) M_A zwischen den Untergruppen. Es lässt sich zeigen¹⁴, dass Gl. 23 gilt

$$(23) \quad M_A = \bar{M} - M_w ,$$

wobei $\bar{M}$ die Minimumfunktion ist, wenn alle N Messdaten der t Untergruppen zu einer einzigen Gruppe zusammengefasst sind. Nun wird die Grösse

$$(24) \quad F = \frac{(N - t) M_A}{(t - 1) M_w}$$

einem F-Test mit $v_1 = (t - 1)$ und $v_2 = (N - t)$ Freiheitsgraden unterworfen.

Ist für ein vorgegebenes Signifikanzniveau α

$$(25) \quad \frac{(N - t) M_A}{(t - 1) M_w} > F_{1-\alpha}(t - 1, N - t) ,$$

so wird die Hypothese verworfen, dass die Daten der untersuchten Untergruppen aus einer einzigen Stichprobe stammen. Die Untergruppen wurden dann nicht zusammengefasst.

Bei der Untersuchung der 14 Messreihen, die aus den Messungen an Erythrozytensuspensionen gewonnen wurden, erfolgte der Test mit dem Signifikanzniveau $\alpha=0,01$ (statistische Sicherheit 99%). Das Ergebnis ist, dass die 14 Untergruppen sich zu 5 Gruppen zusammenfassen lassen (s. Tabelle 3).

6.2 Einfluss der Viskosität einer Lösung auf die Dichtebestimmung mit der Biegeschwingermethode

Der wesentliche Teil des digitalen Densimeters DMA 02C von der Fa. Paar/Heraeus ist ein Glasrohr in U-Form, welches mit der flüssigen oder gasförmigen Messprobe gefüllt werden kann. Von dieser Probe nimmt ein exakt definiertes Volumen an der ungedämpften Schwingung des Glasrohres teil, dabei wird die Eigenfrequenz im Vergleich zum leeren Schwinger geändert. Um die ungedämpften Schwingungen aufrechtzuerhalten, unabhängig von Reibungskräften in einer viskösen Flüssigkeit oder von Reibungsverlusten im Glasrohr, werden die geschwindigkeitsabhängigen Energieverluste des mechanischen Oszillators durch elektronische Mittel mit einer Phasenverzögerung von weniger als 10^{-4} rad^{41,75} ausgeglichen. Diese elektromagnetisch angekoppelte Energiequelle garantiert eine extrem genaue Bestimmung der Dichte einer Probe mit einer instrumentellen Unsicherheit von $1,5 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ in einem Dichtebereich zwischen 0,8 und $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ (Temperaturkonstanz besser als $0,01^\circ\text{C}$ vorausgesetzt). Das Densimetergerät muss mit Luft und Wasser bekannter Dichte kalibriert werden.

Die verwendeten hochkonzentrierten Hb-Mischungen sind sehr viskos und die beobachteten Abweichungen $\Delta v = \delta_k w^k + \delta_l w^l$ (s. Abb. 1 und 3) sind kleiner als $10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Ergänzend zu theoretischen Überlegungen sollte ein experimenteller Nachweis nicht fehlen, dass die beobachteten Werte für Δv reell und keine instrumentellen Artefakte sind. Darüber hinaus zeigen hochviskose Polymere häufig nichtlineare Beiträge zu Reibungskräften. Dieser experimentelle Nachweis wurde durch verschiedene Experimente realisiert.

6.21 Gleichzeitige Dichtemessungen mit einem Pyknometer und dem Densimeter

Die beiden Komponenten eines Epoxyharzes (Araldit G2 von CIBA) wurden vermischt und gleichzeitig in den Biegeschwinger und in ein 2ml-Pyknometer eingefüllt. Durch Polymerisation erhärtet das Harz

und vergrössert dabei monoton seine Dichte und Viskosität. Der Schrumpfprozess des Harzes wurde im Pyknometer optisch durch Beobachtung der Epoxyharzsäule in der Pyknometerkapillare verfolgt. Das Volumen des Pyknometers war vor der Messung durch Einwaage mit Hg bestimmt worden; die Masse der Probe wurde zu Beginn des Experiments durch Vergleich mit dem Wert für das spezifische Volumen des Harzes bestimmt, der gleichzeitig viel genauer mit dem Densimetergerät gemessen wurde. Durch dieses Verfahren konnte das spezifische Volumen des Harzes genauer als sonst üblich mit dem Pyknometer bestimmt werden; die Unsicherheit bei der Einzelmessung betrug etwa $0,5 \times 10^{-4}$ bis $1,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, abhängig von der Beobachtungszeit. Während einer Zeitdauer von 4 bis 6 Stunden nimmt die Dichte des Harzes praktisch linear mit der Zeit zu. Um wieder kleine Abweichungen von dieser Linearität zu zeigen, wird entsprechend zu Gl. 6 die Funktion $\Delta v = v - s_0 - s_1 t$ (t ist die Beobachtungszeit) dargestellt. Abbildung 14 zeigt eine solche Darstellung für ein typisches Experiment, das bei 25°C durchgeführt wurde. Die Messdaten wurden mit der Methode der kleinsten Quadrate angepasst, die ausgezogenen Kurven entsprechen dieser Anpassung.

Beim Vergleich der beiden Messreihen muss noch berücksichtigt werden, dass infolge der exothermen Reaktion bei der Polymerisation des Harzes die Temperaturen im Schwinger und im Pyknometer trotz äusserer Temperierung etwas verschieden waren. Durch separate Messungen mit Thermoelementen wurde festgestellt, dass die Pyknometertemperatur während der gesamten Beobachtungszeit etwa $0,14^\circ\text{C}$ höher lag als die Temperatur des Harzes im Biegeschwinger. Nimmt man eine lineare Wärmedehnzahl von $90 \times 10^{-6}/^\circ\text{C}$ an⁶⁶, so berechnet man, dass die Pyknometerkurve um $3,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ zu hoch liegt. Berücksichtigt man dies, so zeigt der Vergleich, dass sich beide Kurven (einschliesslich der Berücksichtigung der Restfehler) für Beobachtungszeiten $< 3,5 \text{ h}$ an keiner Stelle um mehr als $4 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ unterscheiden.

Da die Viskosität des Harzes die Dichtebestimmung mit dem Pyknometer nicht beeinflusst, folgt aus diesem Vergleich, dass die sehr starke Zunahme der Viskosität des Harzes die Dichtebestim-

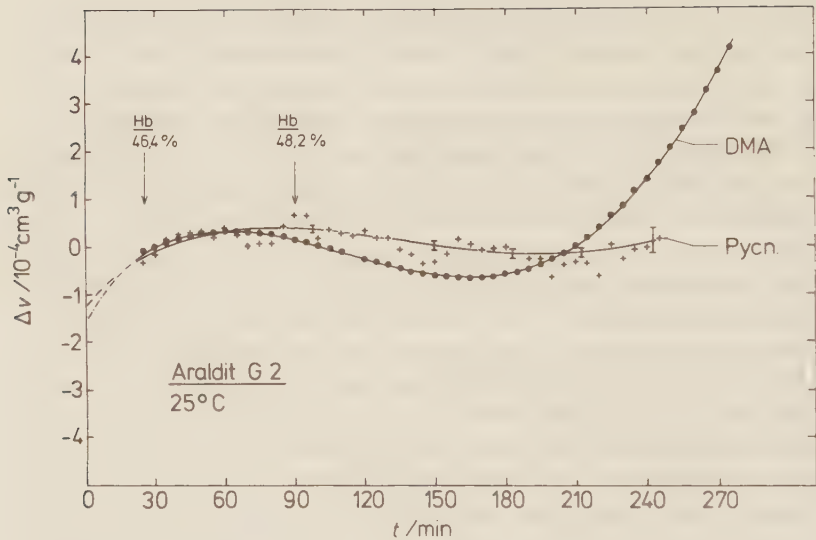


Abb. 14: Experimentelle Abweichung Δv_i des spezifischen Volumens von einer Geraden, $\Delta v_i = v_i \cdot t = 0,889320 + 6,187 \times 10^{-5} t$, als Funktion von der Beobachtungszeit für den Schrumpfprozess bei der Polymerisation eines Epoxyharzes. Die Messungen wurden mit dem Densimeter DMA 02C und mit einem Pyknometer bei 25°C durchgeführt. Die durchgezogenen Kurven entsprechen einem Datenfit durch eine Potenzreihe. Dabei ergab sich für die Densimetermessung $v = 0,88916 - 5,1 \times 10^{-5} t - 1,04 \times 10^{-6} t^{3/2} + 1,12 \times 10^{-10} t^3$, und für die Pyknometermessung $v = 0,88919 - 5,5 \times 10^{-5} t - 6,1 \times 10^{-7} t^{3/2} + 4,8 \times 10^{-11} t^3$. Die Fehlerbalken bei der Pyknometerkurve sind Restfehler, nach Anhang 6.1 berechnet. An den durch Pfeile markierten Beobachtungszeiten haben die Aralditmischungen die gleiche Viskosität wie Hämoglobinemischungen der angegebenen Konzentrationen.

mung mit dem Densimeter - falls überhaupt - um weniger als $4 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ beeinflusst. Das ist der Fall für Mischungen mit Viskositäten, die sehr viel höher liegen als die der konzentriertesten Proteinmischungen, die bei den hier beschriebenen Untersuchungen verwendet wurden. Da bei reinen Hb-Mischungen für

Δv bei $w=0,46$ ein Wert von $\Delta v=7,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ gefunden wurde (s. Abb. 1), kann man den Schluss ziehen, dass dieser Effekt eine reelle Eigenschaft der Hb-Mischung ist.

Der leicht sinusförmige Verlauf der Kurven in Abb. 14 ist wahrscheinlich auf Polymerisationsvorgänge bei der Aushärtung des Harzes zurückzuführen. Wie Abbildung 14 weiter zeigt, sind für Viskositätswerte weit oberhalb von denen für Proteinlösungen (Beobachtungszeiten $> 4\text{h}$ in Abb. 14) die mit dem Densimeter gemessenen Werte für das spezifische Volumen zu gross im Vergleich zu den Pyknometermessungen. Die Abweichung ist entgegengesetzt zu der, die bei hochkonzentrierten Proteinmischungen gefunden wurde. Die Viskosität des Epoxyharzes in dieser Phase der Polymerisation war bereits so gross, dass Drucke von etwa 10^7 Pa ($\sim 100 \text{ atm}$) notwendig waren, um den Biegeschwinger zu füllen. In diesem Bereich machen sich die viskoelastischen Eigenschaften oder die Festkörpereigenschaften der Aralditsäule im Biegeschwinger bemerkbar und beeinflussen die Eigenfrequenz des Schwingers. Als Folge davon steigt die Eigenfrequenz und es ergeben sich falsche und zu kleine Dichtewerte.

6.22 Gleichzeitige Dichtemessungen mit Biegeschwingern verschiedener Eigenfrequenz

In Zusammenarbeit mit H. Stabinger, Graz⁷⁶ wurden gleichzeitige Dichtemessungen an Aralditmischungen (s. 6.21) mit Biegeschwingern verschiedener Eigenfrequenz durchgeführt. Das Verhältnis der Eigenfrequenzen war 1:2:5. Falls ein Reibungseinfluss durch die Viskosität der Probe sichtbar wird, sollten sich die daraus resultierenden Dichteänderungen nach einer Überlegung von Pauly⁸ wie 1:4:25 verhalten. Abgesehen von systematischen Unterschieden zwischen den einzelnen Biegeschwingern unterschieden sich die gemessenen Dichtewerte innerhalb der Beobachtungszeit von 3h jedoch um weniger als $4 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$.

Schliesslich wurde in zwei Biegeschwingern (Eigenfrequenzen wie 1:2) die Dichte von sehr viskosen Rinder Serumalbuminmischungen ($w = 0,35$) gemessen. Beide Messungen unterschieden sich um

$5 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$. Aus früheren Messungen⁷ ergab sich, dass die Abweichung Δv des spezifischen Volumens von Rinderserumalbuminlösungen von dem linearen Teil der Funktion $v = \beta_0 + \beta_1 w$ (s. Gl. 6 und 7) bei $w = 0,35$ grösser als $10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ war. Sollte Δv ein instrumenteller Artefakt infolge nicht erlaubter Vernachlässigung von Reibungsverlusten sein, so sollten sich die Messwerte, die mit den beiden Biegeschwingern erhalten wurden, um mehr als $10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ unterscheiden. Das ist nicht der Fall.

Zusammenfassend kann daher der Schluss gezogen werden, dass die beobachteten Abweichungen $\Delta v = \beta_k w^k + \beta_l w^l$ reelle Eigenschaften von hochkonzentrierten wässrigen Protein-Salz-Mischungen sind und kein Artefakt des Densimetergerätes.

H. Stabinger zog diesen Schluss auch aus theoretischen Überlegungen, indem er die Biegesteifigkeit von viskösen Flüssigkeitssäulen mit der eines Glasrohres verglich.

6.3 Einfluss der Teilchengrösse auf die Dichtebestimmung einer Suspension mit der Biegeschwingermethode

Die Dichtebestimmung einer Suspension mit der Biegeschwingermethode setzt voraus, dass die Teilchen der mechanischen Bewegung des Schwingers folgen können. Darüber hinaus können Schwere- und Zentrifugalkräfte eine Massenverschiebung im Schwinger bewirken und dadurch die Dichtemessung verfälschen. Beide Effekte sollen im folgenden untersucht werden, wobei vereinfachend nur ein Teilchen betrachtet wird.

Den Einfluss der Teilchengrösse kann man durch Lösung der Bewegungsgleichung der erzwungenen Schwingung berechnen.

Für ein Teilchen der Dichte d_T , welches sich in einem Medium der Dichte d_L befindet, gilt (für $d_T > d_L$):

$$(26) \quad m \left(1 - \frac{d_L}{d_T}\right) \ddot{s} + r \dot{s} = K, \quad ,$$

wobei m die Masse des Teilchens ist, $\dot{s}$ seine Geschwindigkeit, $\ddot{s}$ die zeitliche Ableitung von $\dot{s}$, r die Reibungskonstante und $K = K_0 e^{i\omega t}$ die Kraft, die auf das Teilchen wirkt. Das Vorgehen ist hier ähnlich wie bei der Beschreibung der

elektrophoretischen Bewegung von geladenen Teilchen im elektrischen Wechselfeld⁷². Mit dem Ansatz $\dot{s} = \dot{s}_0 e^{i\omega t}$ ergibt sich aus Gl. 26

$$(27) \quad \dot{s}_0 = \frac{K_0}{r} \left[\frac{1}{1 + i\omega T} \right] ,$$

$$\text{mit } T = \frac{m}{r} \left(1 - \frac{d_L}{d_T} \right) .$$

Gl. 27 zeigt die typische Form einer Dispersionskurve mit der charakteristischen Frequenz $2\pi f_0 = 1/T = r/m(1 - \frac{d_L}{d_T})$. Das Frequenzverhalten einer Dispersionskurve wird durch die Funktion $\Delta D/[1 + (f/f_0)^2]$ beschrieben, wobei ΔD die Grösse der Dispersion ist. Für kugelförmige Teilchen gilt $r = 6\pi nR$ (Stoke'sches Gesetz), wobei R der Teilchenradius und n die Viskosität des Mediums ist. Damit ergibt sich

$$(28) \quad f_0 = 9n/4\pi R^2(d_T - d_L) .$$

Mit $(d_T - d_L) = 0,1 \text{ g cm}^{-3}$ und $n = 10^{-3} \text{ Pa s}$ (0,01 Poise) für Elektrolyte ergibt sich für einen Teilchenradius von $3 \text{ }\mu\text{m}$ eine charakteristische Frequenz von $f_0 = 796 \text{ kHz}$. Da die Eigenfrequenz des Biegeschwingers bei etwa $0,5 \text{ kHz}$ liegt, kann daraus geschlossen werden, dass z.B. Erythrozyten der mechanischen Bewegung des Schwingers folgen können. Aus Gl. 27 ergibt sich weiter, dass bei einem Dichteunterschied von $0,1 \text{ g cm}^{-3}$ erst bei Teilchengrössen ab 20 bis $30 \text{ }\mu\text{m}$ Teilchenradius eine messbare Beeinflussung der Dichtemessung zu erwarten ist.

Ob Zentrifugalkräfte zu einer Sedimentation von kugelförmigen Teilchen führen können, kann aus Gl. 29 berechnet werden, in der Zentrifugalkraft und Reibungskraft gleichgesetzt sind:

$$(29) \quad \frac{u^2}{x} \left(\frac{4}{3}\pi R^3 \right) (d_T - d_L) = 6\pi nR \left(\frac{dx}{dt} \right) ,$$

dabei ist x der Abstand des Teilchens vom Schwingungsknoten des Biegeschwingers, dx/dt die radiale Geschwindigkeit des Teilchens (Sedimentationsgeschwindigkeit), u die tangentielle Geschwindigkeit des Teilchens. Mit $u = \omega A \sin \omega t$ (A ist die Amplitude und $f = \omega/2\pi$ die Frequenz des Biegeschwingers) muss schliesslich folgende Gleichung integriert werden:

$$(30) \quad \omega^2 A^2 \cdot \frac{2}{9\eta} R^2 (d_T - d_L) \sin^2 \omega t \, dt = \frac{dx}{x} .$$

Die Integration ergibt

$$(31) \quad \ln\left(\frac{x_1}{x_0}\right) = \frac{4\pi^2}{9\eta} A^2 R^2 (d_T - d_L) \cdot f ,$$

wobei $(x_1 - x_0)$ der pro Sekunde zurückgelegte Weg des Teilchens ist.

Mit $f = 0,5$ kHz, einer Amplitude des Schwingers von $A = 0,01 \text{ cm}^{41,75}$, $x_0 = 5 \text{ cm}$, $R = 3 \times 10^{-4} \text{ cm}$, $(d_T - d_L) = 0,1 \text{ g cm}^{-3}$, $\eta = 10^{-3} \text{ Pa s}$ ergibt sich eine Sedimentationsgeschwindigkeit infolge der Zentrifugalkraft von $\frac{dx}{dt} = 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$.

Dieser Wert lässt sich mit der Sedimentation vergleichen, die durch das Schwerfeld verursacht wird. Durch das Gleichsetzen von Schwerkraft und Reibungskraft errechnet sich eine Sedimentationsgeschwindigkeit dx/dt von

$$(32) \quad \frac{dx}{dt} = \frac{2 R^2 g (d_T - d_L)}{9\eta} ,$$

wobei g die Erdbeschleunigung ist. Es ergibt sich mit den obigen Daten ein Wert von $dx/dt = 2 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. Dieser Wert ist um einen Faktor 200 grösser als der oben berechnete und so gross, dass es während der Messzeit (ca. 7 min) bereits zu einer merklichen Sedimentation kommt. Da die beiden Schenkel des U-Rohres des Biegeschwingers vertikal angeordnet sind, kommt es durch Sedimentation zu einer Verschiebung der Massenbelegung des Schwingers und damit

zu einer messbaren Veränderung der Frequenz des Schwingers. Dieser Effekt ist zu beobachten, wenn etwa Blut als Messprobe für das Densimetergerät verwendet wird. Die Eigenfrequenz des Biegeschwingers zeigt eine ständige Drift. Bei dichtgepackten Sedimenten tritt dieser Effekt nicht auf.

6.4 Korrekturformeln für das Zwischenzellvolumen von gepackten Erythrozytensuspensionen

6.40 Vorbemerkung

Die gepackten Suspensionen von Erythrozyten enthalten einen Volumenanteil zwischen den Zellen, der mit Aussenlösung gefüllt ist. Daher wurden von jeder Messprobe die Hämatokritwerte bestimmt. Die gemessenen Werte des spezifischen Volumens v und des Massenanteils w werden zunächst nur bzgl. dieses von der Hämatokrit-zentrifuge erfassten Zwischenzellvolumens korrigiert. Der Einfluss von weiteren unbekannten Anteilen an Zwischenzellvolumen auf die Schlussfolgerungen in dieser Arbeit wird in Abschnitt 6.43 diskutiert.

6.41 Korrektur der Dichtemessungen

Für eine Suspension (Index s für Suspension) von Erythrozyten (Index e für Erythrozyten), die einen Volumenanteil V_z an Zwischenzellvolumen enthält (Index z für Zwischenzellvolumen), gilt für die Massenanteile der Komponenten

$$(33) \quad m_e + m_z = m_s \quad .$$

Mit $m=V/v$ (v :spezif. Volumen) folgt für das spezifische Volumen v_e der Erythrozyten ohne Zwischenzellvolumen

$$(34) \quad v_e = \frac{(V_s - V_z) v_s v_z}{v_z V_s - v_s V_z} \quad .$$

Der Hämatokritwert H wird bestimmt, v_s ist bekannt und das spezifische Volumen v_z des Überstandes wird ebenfalls gemessen. Mit

$$(35) \quad H = V_e/V_s, \quad ,$$

und mit $V_e + V_z = V_s$ ergibt sich schliesslich aus Gl. 34 als Korrekturformel für die v -Werte:

$$(36) \quad v_e = \frac{H \cdot v_s}{1 - \frac{v_s}{v_z} (1-H)} .$$

6.42 Korrektur der Trockengewichte

Gesucht ist der Massengehalt w_e der "ideal" dicht gepackten Erythrozyten,

$$(37) \quad w_e = \frac{m_{e,t}}{m_e}, \quad ,$$

wobei der zusätzliche Index t den Trockenanteil der entsprechenden Komponente bezeichnen soll. Aus der bekannten Grösse $w = (m_{e,t} + m_{z,t})/m_s$ folgt mit Gl. 33 und Gl. 35 schliesslich

$$(38) \quad w_e = \frac{w - \frac{m_{z,t}}{m_s}}{1 - (1-H) \frac{v_s}{v_z}} .$$

Die Grösse $m_{z,t}/m_s$ in Gl. 38 lässt sich umschreiben in

$$(39) \quad \frac{m_{z,t}}{m_s} = (1-H) \frac{v_s}{v_z} w_z, \quad ,$$

wobei $w_z = m_{z,t}/m_z$. Zwischen v_z und w_z besteht in erster Näherung eine lineare Beziehung (spezifisches Volumen von Salzlösungen)

$$(40) \quad v_z = \beta_0 + \beta_1 w_z \quad .$$

Die Koeffizienten wurden aus Messungen von v_z und w_z an den Überständen der Erythrozytensedimente bestimmt. Es ergibt sich $\beta_0 = 1,002857 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ und $\beta_1 = -0,744932 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (bei 25°C). Mit Gl. 39 und Gl. 40 folgt schliesslich aus Gl. 38 als Korrekturformel für die Trockengewichte

$$(41) \quad w_e = \frac{w - (1-H) \frac{v_s(v_z - \beta_0)}{v_z \beta_1}}{1 - \frac{v_s}{v_z} (1-H)} \quad .$$

6.43 Über den Einfluss des unbekannten Zwischenzellvolumens

Bei der dichtesten Kugelpackung gleich grosser harter Kugeln lässt sich das Volumen zwischen den Kugeln berechnen. Es beträgt etwa 25% des Gesamtvolumens, das die Kugelpackung einnimmt. Bei der tellerartigen Form der Erythrozyten kann für eine feste Packung nach dem Zentrifugieren davon ausgegangen werden, dass das Zwischenzellvolumen wesentlich kleiner ist. Möglicherweise spielt auch eine Verformung der Erythrozyten eine Rolle. Bei der Darstellung von Abbildung 7 und Tabelle 2 war nur der Einfluss des Zwischenzellvolumens berücksichtigt worden, der mit der Hämatokritzentrifuge erfasst wurde. Dabei stellte sich heraus, dass sich die geschrumpften Erythrozyten im Mittel etwas besser packen liessen als die geschwollenen Zellen.

Man kann die Korrekturgleichungen 36 und 41 dazu benutzen, um den Einfluss eines grösseren Zwischenzellvolumens auf die Schlussfolgerungen in dieser Arbeit zu diskutieren. Nimmt man 5% Zwischenzellvolumen für alle Messpunkte von Abbildung 7 an, so verschieben sich die Punkte in Abbildung 7 um das 5 - 10fache, wie in der Abbildung dargestellt (die Richtung der Verschiebung bleibt). Trotz dieser grossen Verschiebung ändern sich die Werte für β_0 und $\beta_0 + \beta_1$ nur wenig, wie der Vergleich mit Tabelle 2 zeigt. Es ergibt sich für $H = 0.95$:

$$\beta_0 = 1,0038 \underset{3}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}} \text{ und } (\beta_0 + \beta_1) = 0,7460 \underset{6}{\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}} .$$

6.5 Suspensionen von Kugeln mit Schale als Modelle für Wasser-Hämoglobin-Mischungen

6.51 Vorbemerkung

In diesem Abschnitt werden Stösse von Kugeln mit Schale als einfaches Modell für Mischungen von Wasser und Proteinmolekülen behandelt. Das Problem lässt sich analytisch nur bis zu einem Massengehalt w von $w = 0,1$ bis $0,15$ behandeln. Näherungsformeln müssen auf ihre Richtigkeit überprüft werden, wenn es zu Vielfachstössen kommt, was bei den angenommenen Kugelgrössen etwa ab $w = 0,25$ auftritt. Die hier beschriebenen Rechnungen wurden daher numerisch durchgeführt, und zwar bis zu Konzentrationen, bei denen keine Kugel mehr "frei" beweglich ist. Bei Kugelradien von 3 nm ($30 \text{ \AA}$) ist das je nach Anordnung der Kugeln bei einem Massengehalt von $0,44$ bis $0,60$ der Fall. Da solche Rechnungen meines Wissens noch nie durchgeführt worden sind, werden die notwendigen Formeln und Grenzwerte ausführlich dargestellt. Die numerischen Rechnungen wurden mit einem Tischrechner (HP 9100A mit 9101A von Hewlett & Packard) sowie parallel mit einem Rechner-System ELVIRA 4-16 E (Rechner PDP 8 von Friesseke & Hoepfner)⁶⁰ durchgeführt. Selbst bei der grösseren Anlage war die Rechenzeit für eine Berechnung von Δv für 10 Werte von w etwa 4 Stunden.

6.52 Annahmen und Bezeichnungen

Die Proteinmoleküle werden als Kugeln mit einem effektiven Radius r_2 (Index 2 für Proteine) angenommen. Sie besitzen eine "feste" Wasserhülle, die in r_2 enthalten sein soll.

Die Proteinmoleküle sollen - im zeitlichen und räumlichen Mittel - in einem hexagonalen Gitter angeordnet sein (dichteste Kugelpackung; Gitterkonstante a).

In einem cm^3 der Mischung befinden sich N Moleküle, wobei

$$(42) \quad N = \frac{N_A \cdot w}{M \cdot \bar{v}},$$

dabei ist N_A die Avogadro-Konstante, M die molare Masse, w der Massenbruch und $\tilde{v} = v_1^0 + \beta_1 w$ der lineare Teil von Gl. 6 (ohne Protein-Protein-Wechselwirkung). Jedes Proteinmolekül (Zentralkugel) ist im zeitlichen und räumlichen Mittel von 12 Nachbarkugeln (Abstand a) umgeben. N und a hängen für eine bestimmte Proteinart nur von w ab.

Es wird die Bewegung der Zentralkugel in dem ihr zur Verfügung stehenden Raum betrachtet. Dabei wird angenommen, dass der Mittelpunkt der Zentralkugel im zeitlichen Mittel jeden Raumpunkt des der Kugel zugänglichen Raumes mit gleicher Wahrscheinlichkeit einnehmen kann. Bei der Kollision mit den benachbarten Kugeln infolge der Brown'schen Molekularbewegung kann es zu Wechselwirkungen von Wassermolekülen in der Umgebung der stossenden Proteinmoleküle kommen. Es werden zwei alternative Modelle betrachtet.

Überlappungsmodell

Es wird angenommen, dass ein Proteinmolekül neben seiner "festen" Hydrathülle einen weiteren Anteil "locker" gebundenes Wasser mit sich führt (Radius R ; die "locker" gebundene Wasserhülle ist in v_2^∞ enthalten). Beim Stoss von Molekülen wird es zu Überlappungen dieser Bereiche kommen. Aus Platzgründen geht während des Stossereignisses von je 2 Kugeln ein Teil des "locker" gebundenen Wassers (2 Kugelabschnitte, spezifisches Volumen v_{1b}) in das "freie" Wasser über (spezifisches Volumen v_{1f}) und erklärt die Beobachtung von $\Delta v < 0$ (s. Abb. 15). Es gilt mit Gl. 42

$$(43) \quad \Delta v = - \frac{1}{2} \frac{N_A w}{M(v_1^0 + \beta_1 w)} V_0 (v_{1b} - v_{1f}) ,$$

wobei V_0 das mittlere Überlappungsvolumen pro Molekül ist, welches berechnet werden soll. Der Faktor $\frac{1}{2}$ ist anzubringen, da jede Kugel die stossende sein kann.

Kooperatives Modell

Dieses Modell geht ebenfalls von Proteinmolekülen mit einem fest gebundenen Wasseranteil aus (Radius r_2). Die Möglichkeit einer

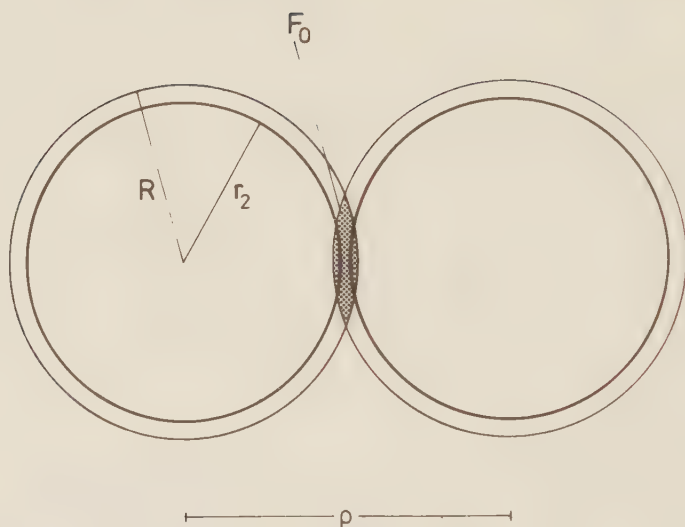


Abb. 15: Überlappung von Kugelschalen. Das Überlappungsvolumen F_0 gegeben durch $\frac{1}{12}\pi(16R^3 - 12R^2\rho + \rho^3)$.

weiteren "locker" gebundenen Wasserhülle ist erlaubt, aber nicht notwendig. Die neue Annahme ist nun folgende: Sobald bei der Annäherung zweier Moleküle der Abstand $2R$ erreicht wird, soll zwischen den Kugeln in einem zylinderförmigen Bereich besonders "strukturiertes" Wasser gebildet werden, welches die Beobachtung von $\Delta v < 0$ erklärt (s. Abb. 16). Das Volumen F_c dieses Bereiches soll sich bei weiterer Annäherung der Kugeln bis zum "harten"Stoss nur noch verschieben können, jedoch soll die Grösse erhalten bleiben. Mit dieser Annahme könnte die endliche Ausdehnung der Wassermoleküle berücksichtigt werden.

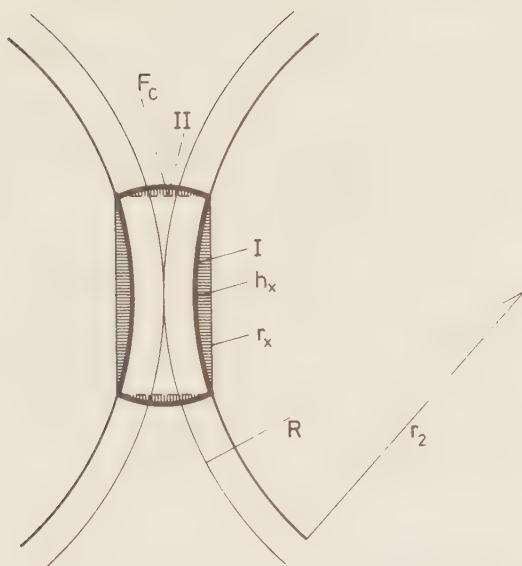


Abb. 16: Volumen F_c beim kooperativen Modell. Die Krümmung des Rotationskörpers II (senkrecht schraffiert) sei so gewählt, dass dessen Volumen dem der beiden Kugelhappen I (waagrecht schraffiert) entspricht. Dann ergibt sich für F_c einfach $F_c = 2\pi r_x^2 (R - r_2 + h_x)$.

Die Grösse von F_c sei gegeben durch $F_c = 2\pi r_x^2 (R - r_2 + h_x)$. Das lässt sich dann erreichen, wenn die Volumen des Rotationskörpers II (s. Abb. 16) und der beiden Kugelhappen I einander gleich sind. Zwischen r_x und h_x besteht die Beziehung $r_x^2 = h_x (2r_2 - h_x)$. Die Grösse h_x soll durch einen im Vergleich zum Überlappungsmodell hier zusätzlichen Parameter γ ,

$$(44) \quad h_x = \gamma (R - r_2) ,$$

festgelegt werden. Mit Gl. 44 ergibt sich schliesslich

$$(45) \quad F_c = 2\pi(R-r_2)^2 [2r_2 - \gamma(R-r_2)] \gamma(1+\gamma) \quad .$$

Innerhalb des Volumens F_c soll das "freie" Wasser (spezifisches Volumen v_{1f}) in besonders strukturiertes Wasser (spezifisches Volumen v_{1b}) übergehen, wobei sich analog zu Gl. 43 schreiben lässt:

$$(46) \quad \Delta v = - \frac{1}{2} \frac{N_A w}{M(v_{1o} + \beta_1 w)} V_c (v_{1f} - v_{1b}) \quad ,$$

wobei V_c das mittlere "kooperative" Volumen pro Molekül ist. Man beachte, dass bereits vom Ansatz her die Differenzen der beiden spezifischen Volumina in den Gl. 43 und 46 mit verschiedenem Vorzeichen auftreten.

6.53 Allgemeine geometrische Überlegungen zur Berechnung von V_o

Zur Berechnung von V_o wird eine hexagonale Einheitszelle betrachtet, die aus 8 dreiseitigen und 6 vierseitigen Pyramiden besteht. Jede der 8 dreiseitigen Pyramiden lässt sich in 6 gleiche dreiseitige Unterpyramiden (Typ P) unterteilen (s. Abb. 17).

Jede der 6 vierseitigen Pyramiden besteht aus 8 gleichen dreiseitigen Unterpyramiden (Typ $\bar{P}$, vergl. Abb. 18).

Die ganze hexagonale Einheitszelle setzt sich aus je 48 Unterpyramiden des Typs P und $\bar{P}$ zusammen. Zur Berechnung von V_o werden daher nur diese beiden Pyramidentypen betrachtet. Dabei sind noch folgende Überlegungen wichtig (vergl. Abb. 17 und 18):

- a) Für die Rechnung wird angenommen, dass sich die Zentralkugel nur innerhalb der Pyramiden P und $\bar{P}$ bewegen und sich der Kugel 1 bis auf einen Abstand von $2r_2$ nähern kann (Grenze "hard collision"). Damit sind die für den Mittelpunkt der Zentralkugel überhaupt zugänglichen Volumenbereiche τ bzw. $\bar{\tau}$ definiert.

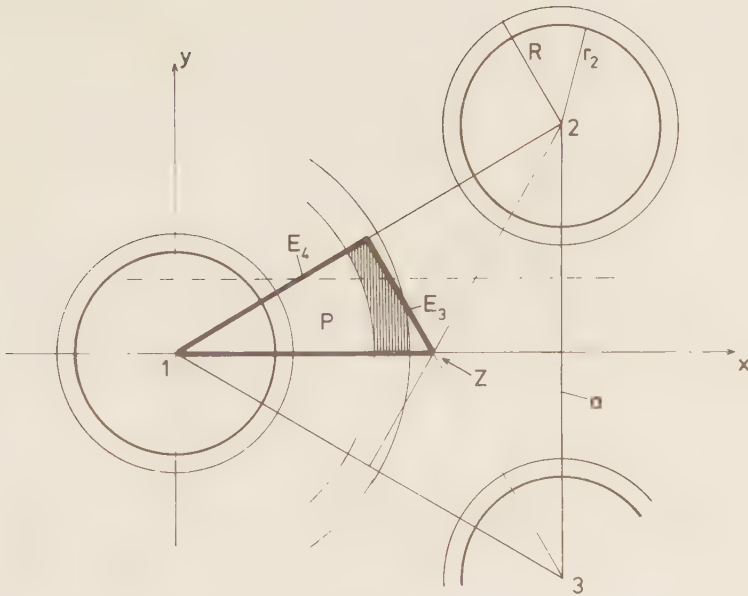


Abb. 17: Dreiseitige Pyramide aus einer hexagonalen Einheitszelle. Schnitt durch die Ebene $z = 0$. Die eingezeichneten Kugeln haben folgende Koordinaten (x, y, z) : Kugel 1: $(0, 0, 0)$, Kugel 2: $(\frac{1}{2}\sqrt{3}a, \frac{1}{2}a, 0)$; Kugel 3: $(\frac{1}{2}\sqrt{3}a, -\frac{1}{2}a, 0)$; die Ruhekoordinaten der Zentralkugel Z sind $(\frac{1}{3}\sqrt{3}a, 0, \sqrt{\frac{2}{3}}a)$. Die Unterpyramide P wird von folgenden Ebenen begrenzt: $E_1 : z=0$; $E_2 : y=0$, $E_3 : x=\frac{1}{3}\sqrt{3}(a-y)$; $E_4 : x=\sqrt{3}y+\frac{1}{2}\sqrt{2}z$. Im schraffierten Bereich tritt die Berührungssphäre durch die z -Ebene. Die gestrichelte Linie ist ein Schnitt parallel zur Ebene $y=0$, der in Abb. 19 als Aufsicht gezeigt ist.

- b) Innerhalb des so definierten zugänglichen Volumens kann es zu Überlappungen zwischen Zentralkugel und Kugel 1 nur kommen, wenn sich der Mittelpunkt der Zentralkugel innerhalb einer "Berührungssphäre" befindet, die eine Kugelschale um Kugel 1 mit den Radien $2r_2$ und $2R$ darstellt und die von

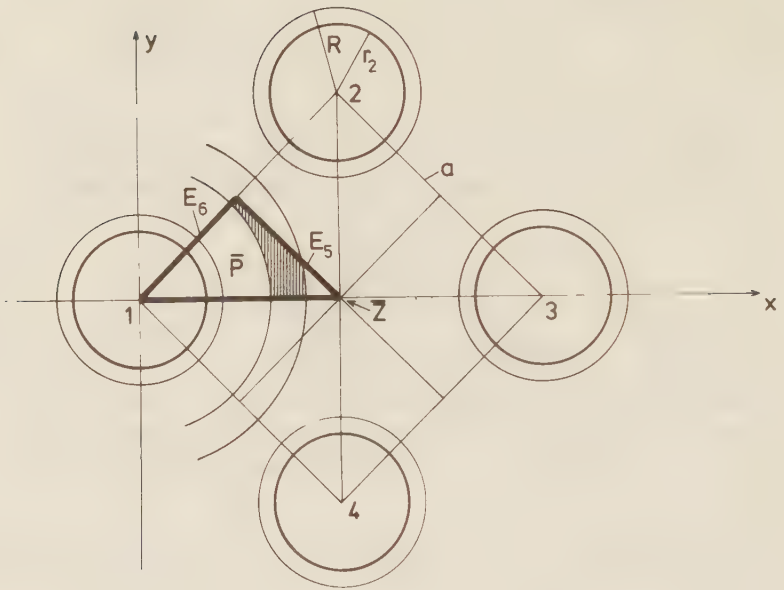


Abb. 18: Vierseitige Pyramide aus einer hexagonalen Einheitszelle. Schnitt durch die Ebene $z=0$. Die eingezeichneten Kugeln haben folgende Koordinaten:
 Kugel 1 : $(0, 0, 0)$; Kugel 2 : $(\frac{1}{2}\sqrt{2}a, \frac{1}{2}\sqrt{2}a, 0)$;
 Kugel 3 : $(\sqrt{2}a, 0, 0)$; Kugel 4 : $(\frac{1}{2}\sqrt{2}a, -\frac{1}{2}\sqrt{2}a, 0)$;
 die Ruhekoordinaten der Zentralkugel Z sind $(\frac{1}{2}\sqrt{2}a, 0, \frac{1}{2}\sqrt{2}a)$. Die Unterpyramide $\bar{P}$ wird von folgenden Ebenen begrenzt:
 $E_5 : x = \frac{1}{2}\sqrt{2}a - y$; $E_6 : x = y + z$; $E_7 : z = 0$; $E_8 : y = 0$.

der Pyramide geschnitten wird. Damit ist der Bereich festgelegt, in dem es für einen gegebenen Gitterabstand a überhaupt zu Überlappungen zwischen der Zentralkugel und Kugel 1 kommen kann.

- c) Überlappungen mit anderen Kugeln der hexagonalen Einheitszelle (Mehrfachüberlappungen) können, falls überhaupt, nur stattfinden, wenn sich der Mittelpunkt der Zentralkugel in

der Berührungssphäre befindet. Das muss so sein, weil in den Unterpyramiden die Abstände zu allen anderen Kugeln der hexagonalen Einheitszelle gleich oder grösser als die Abstände zur Kugel 1 sind und weil Überlappungen andererseits dort verboten sind, wo der Abstand zur Kugel 1 kleiner als $2r_2$ ist. Damit sind die Orte für Mehrfachüberlappungen auf Unterbereiche innerhalb der "Berührungssphäre" beschränkt.

6.54 Die Berechnung von V_0

Für das mittlere Überlappungsvolumen pro Zentralkugel ergibt sich

$$(47) \quad V_0 = \frac{\int_{\tau} F_0 dV + \int_{\bar{\tau}} \bar{F}_0 dV}{\int_{\tau} dV + \int_{\bar{\tau}} dV},$$

wobei F_0 und $\bar{F}_0$ das tatsächliche Überlappungsvolumen für jeden Raumpunkt der Berührungssphäre ist; τ bzw. $\bar{\tau}$ sind bereits definiert.

Die vier Integrale werden nun explizit angegeben. Zur Festlegung der Integrationsgrenzen sind die Schnittkurven der "Berührungssphäre" mit den Ebenen der beiden Pyramidentypen zu bestimmen. Als Beispiel zeigt Abbildung 19 einen Schnitt in einer Ebene parallel zur Ebene $y=0$ (in Abb. 17 gestrichelt dargestellt).

Die vollständigen Ausdrücke sind so geschrieben, dass sie für die numerische Integration verwendet werden können. Im vorliegenden Fall erfolgt die Integration nach der Regel von Simpson.

Die einzelnen Integrale in Gl. 47 sind in Gl. 48 und Gl. 50 - 52 angegeben.

$$(48) \quad \int_{\tau} F_0 dV = \int_0^{(y_1)^{**}} \left\{ \int_{(z_1)^{**}}^{\text{Min}(z_2, z_3)} \left[\int_{\text{Max}(x_1, x_2)^{**}}^{\text{Min}(x'_2, x'_3)} \left(F_{01} + \sum_{i=2}^{12} F_{0i} \delta_i \right) dx \right] dz \right\} dy$$

Die Integrationsgrenzen sind in den Gl. 53 - 66 angegeben.

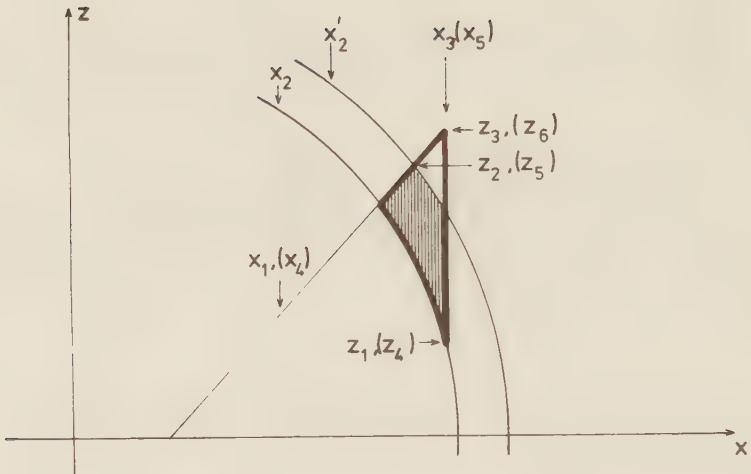


Abb. 19: Zur Bezeichnung der Integrationsgrenzen: Schnitt durch eine Ebene parallel zur Ebene $y=0$. Die Integration erfolgt nur innerhalb des dick umrandeten Gebietes. Überlappungen können nur innerhalb des schraffierten Bereiches auftreten. Die in Klammern gesetzten Symbole beziehen sich auf den Pyramidentyp $\mathbb{P}$.

Die Symbole an den Integrationsgrenzen haben folgende Bedeutung:

- $(y_1)^{**}$: 1. wenn $a > 4R$, setze $(y_1)^{**} = R$,
 2. wenn Radikand von y_1 kleiner als 0 ist,
 setze Radikand 0.

Größen mit einem Stern: wenn Radikand < 0 , setze Radikand 0.

$$(49) \quad F_{0i} = \frac{1}{12} \pi (16R^3 - 12R^2 \rho_i + \rho_i^3), \text{ für } i = 1, \dots, 12.$$

Die Abstände ρ_i zwischen Zentralkugel und Kugel i in der hexagonalen Einheitszelle für den Pyramidentyp P sind in Gl. 67 - 78 angegeben.

δ_i : für $\rho_i > 2R$ ist $\delta_i = 0$ (d.h. kein Beitrag zur Überlappung), sonst $\delta_i = 1$.

$$(50) \quad \int_0^{\bar{\tau}} \bar{F}_0 dV = \int_0^{(y_1)^{**}} \left\{ \int_{(z_1)^*}^{\text{Min}(z_6, z_6)} \left[\int_{\text{Max}[(x_2)^*, x_1]}^{\text{Min}(x'_2, x_3)} \left(F_{01} + \sum_{i=2}^{12} \bar{F}_{0i} \delta_i \right) dx \right] dz \right\} dy$$

$(y_2)^{**}$: 1. wenn $a > 4R$, setze $(y_2)^{**} = \sqrt{2} R$,
2. wenn Radikand von $y_2 < 0$ ist, setze Radikand 0.

$\bar{F}_{0i}, \bar{\delta}_i$: wie δ_i und F_{0i} , aber mit $\bar{\rho}_i$ statt mit ρ_i .

Die Abstände $\bar{\rho}_i$ zwischen Zentralkugel und Kugel i in der hexagonalen Einheitszelle sind für den Pyramidentyp $\bar{P}$ in Gl. 67 und Gl. 79 - 89 angegeben.

$$(51) \quad \int_0^{\tau} dV = \int_0^{(y_1)^*} \left\{ \int_{(z_1)^*}^{z_3} \left[\int_{\text{Max}[x_1, (x_2)^*]}^{x_3} dx \right] dz \right\} dy$$

$$(52) \quad \int_0^{\bar{\tau}} dV = \int_0^{(y_2)^*} \left\{ \int_{(z_1)^*}^{z_6} \left[\int_{\text{Max}[(x_2)^*, x_1]}^{x_3} dx \right] dz \right\} dy$$

Zusammenstellung der Integrationsgrenzen und der Kugelabstände

$$(53) \quad x_1 = \sqrt{3} y + z/\sqrt{2}$$

$$(54) \quad x_2 = (4r_2^2 - y^2 - z^2)^{\frac{1}{2}}$$

$$(55) \quad x_2' = (4R^2 - y^2 - z^2)^{\frac{1}{2}}$$

$$(56) \quad x_3 = \sqrt{\frac{1}{3}} (a-y)$$

$$(57) \quad x_4 = y + z$$

$$(58) \quad x_5 = \sqrt{\frac{1}{2}} a - y$$

$$(59) \quad z_1 = \left[(4r_2^2 - \frac{1}{3}a^2) + \frac{2}{3}ay - \frac{4}{3}y^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$(60) \quad z_2 = (\frac{8}{3}R^2 - 2y^2)^{\frac{1}{2}} - \sqrt{\frac{2}{3}}y$$

$$(61) \quad z_3 = \sqrt{\frac{2}{3}}(a - 4y)$$

$$(62) \quad z_4 = \left[(4r_2^2 - \frac{1}{2}a^2) + \sqrt{2}ay - 2y^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$(63) \quad z_5 = (2R^2 - \frac{3}{4}y^2)^{\frac{1}{2}} - \frac{1}{2}y$$

$$(64) \quad z_6 = \sqrt{\frac{1}{2}}a - 2y$$

$$(65) \quad y_1 = \frac{a}{4} - \sqrt{\frac{1}{12}}(4r_2^2 - \frac{1}{4}a^2)^{\frac{1}{2}}$$

$$(66) \quad y_2 = \frac{1}{4}\sqrt{2}a - \sqrt{\frac{1}{6}}(4r_2^2 - \frac{1}{4}a^2)^{\frac{1}{2}}$$

$$(67) \quad g_1^2 = \bar{g}_1^2 = x^2 + y^2 + z^2$$

$$(68) \quad g_2^2 = (x - \frac{1}{2}\sqrt{3}a)^2 + (y - \frac{a}{2})^2 + z^2$$

$$(69) \quad g_3^2 = (x - \frac{1}{2}\sqrt{3}a)^2 + (y + \frac{a}{2})^2 + z^2$$

$$(70) \quad g_4^2 = (x - \frac{1}{3}\sqrt{3}a)^2 + (y + a)^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(71) \quad g_5^2 = (x - \frac{5}{6}\sqrt{3}a)^2 + (y + \frac{a}{2})^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(72) \quad g_6^2 = (x - \frac{5}{6}\sqrt{3}a)^2 + (y - \frac{a}{2})^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(73) \quad g_7^2 = (x - \frac{1}{3}\sqrt{3}a)^2 + (y-a)^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(74) \quad g_8^2 = (x + \frac{1}{6}\sqrt{3}a)^2 + (y - \frac{a}{2})^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(75) \quad g_9^2 = (x + \frac{1}{6}\sqrt{3}a)^2 + (y + \frac{a}{2})^2 + (z - \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(76) \quad g_{10}^2 = (x - \frac{1}{6}\sqrt{3}a)^2 + (y + \frac{a}{2})^2 + (z - 2\sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(77) \quad g_{11}^2 = (x - \frac{2}{3}\sqrt{3}a)^2 + y^2 + (z - 2\sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(78) \quad \varrho_{12}^2 = (x - \frac{1}{6} \sqrt{3}a)^2 + (y - \frac{a}{2})^2 + (z - 2 \sqrt{\frac{2}{3}}a)^2$$

$$(79) \quad \bar{\varrho}_2^2 = (x - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (y - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + z^2$$

$$(80) \quad \bar{\varrho}_3^2 = (x - \sqrt{2}a)^2 + y^2 + z^2$$

$$(81) \quad \bar{\varrho}_4^2 = (x - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (y + \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + z^2$$

$$(82) \quad \bar{\varrho}_5^2 = x^2 + (y - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2$$

$$(83) \quad \bar{\varrho}_6^2 = x^2 + (y + \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2$$

$$(84) \quad \bar{\varrho}_7^2 = (x - \sqrt{2}a)^2 + (y - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2$$

$$(85) \quad \bar{\varrho}_8^2 = (x - \sqrt{2}a)^2 + (y + \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2$$

$$(86) \quad \bar{\varrho}_9^2 = x^2 + y^2 + (z - \sqrt{2}a)^2$$

$$(87) \quad \bar{\varrho}_{10}^2 = (x - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (y - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \sqrt{2}a)^2$$

$$(88) \quad \bar{\varrho}_{11}^2 = (x - \sqrt{2}a)^2 + y^2 + (z - \sqrt{2}a)^2$$

$$(89) \quad \bar{\varrho}_{12}^2 = (x - \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (y + \frac{1}{2} \sqrt{2}a)^2 + (z - \sqrt{2}a)^2$$

6.55 Die Berechnung von V_c

Das mittlere "kooperative" Volumen pro Zentralkugel ergibt sich analog zu Gl. 47 aus

$$(90) \quad V_c = \frac{\int_{\bar{r}}^{\bar{r}} F_c dV + \int_{\bar{r}}^{\bar{r}} \bar{F}_c dV}{\int_{\bar{r}}^{\bar{r}} dV + \int_{\bar{r}}^{\bar{r}} dV}.$$

Die einzelnen Integrale sehen wie Gl. 48 und Gl. 50 - 52 aus, nur wird nun F_0 und $\bar{F}_0$ ersetzt durch die entsprechenden Ausdrücke für F_c (s. Gl. 45).

6.56 Ergebnisse

In den Abbildungen 20 - 23 werden die berechneten Werte für Δv mit den experimentell gefundenen Werten Δv (für $\alpha = 0$, s. Abb. 1) verglichen. Dabei werden verschiedene Parameter in den Modellen variiert.

Abbildung 20 zeigt den Einfluss von r_2 bei konstanter Schalendicke $R-r_2$ für das Überlappungsmodell. Für $(R-r_2)$ ist ein Wert von 0,3 nm angenommen, was etwa dem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht. Die Werte für $(v_{1b} - v_{1f})$ sind so gewählt worden, dass alle Kurven sich in einem Punkt bei $w = 0,36$ schneiden.

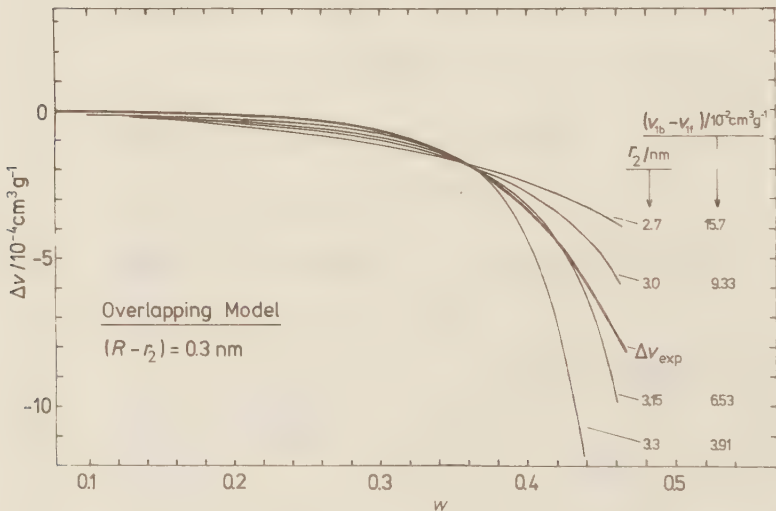


Abb. 20: Einfluss von r_2 beim Überlappungsmodell. Schalendicke $(R-r_2) = 0,3$ nm. Die Werte für $(v_{1b} - v_{1f})$ sind so gewählt, dass sich alle Kurven bei $w = 0,36$ schneiden.

Man sieht, dass die Kurven mit $r_2 = 2,7$ nm und $r_2 = 3,3$ nm die gemessene Kurve nur schlecht approximieren. Die beste Näherung ergibt die Kurve mit $r_2 = 3,15$ nm. Man beachte durch Vergleich mit Abbildung 1, dass die gemessenen Punkte für $w > 0,44$ durch diese berechnete Kurve noch etwa besser wiedergegeben werden als durch den Datenfit. Was bedeutet eine Annahme von $r_2 = 3,15$ nm und $(R-r_2) = 0,3$ nm für das Hb-Molekül?

Die Struktur des Hämoglobinmoleküls mit den beiden α - und β -Ketten ist im Detail bekannt. Das hoch organisierte und komplexe System schliesst eine kurze einfache Beschreibung aus, jedoch kann für die Modellüberlegungen hier ein fast kugelförmiges Ellipsoid der Grösse $6,5 \times 5,5 \times 5,0$ nm³ angenommen werden⁸⁰. Rechnet man diese Daten in eine gleich grosse Kugel um, so ergibt sich ein Kugelradius von 2,82 nm. $r_2 = 3,15$ nm als Radius für die "harte" Kugel bedeutet daher ein Hämoglobinmolekül mit einer Wasserhülle, die dem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht. Dieses hydratisierte Molekül führt eine weitere Schicht "locker" gebundenen Wassers mit sich, welches an dem Überlappungseffekt teilnimmt.

Als nächstes soll beim Überlappungsmodell der Einfluss von $(v_{1b} - v_{1f})$ auf die Kurvenform betrachtet werden. Das ist in Abbildung 21 gezeigt.

Für alle berechneten Kurven sind Werte von $r_2 = 3,0$ nm und $(R-r_2) = 0,3$ nm angenommen. Die gewählten Werte für $(v_{1b} - v_{1f})$ entsprechen einer Übereinstimmung der jeweiligen Kurven mit den gemessenen Δv -Werten bei $w = 0,3$, $w = 0,36$ und $w = 0,40$. Die Kurven sollen verdeutlichen, warum als Kompromiss für alle weiteren Betrachtungen eine Normierung bei $w = 0,36$ gewählt wurde. Bei der gestrichelten Kurve in Abbildung 21 ist der Fall betrachtet worden, dass alle Kugeln in Ruhe sind und Überlappungen erst auftreten, wenn der Gitterabstand a kleiner als $2R$ ist (statisches Modell). Die Kurve zeigt, dass ein statisches Modell die experimentellen Ergebnisse überhaupt nicht beschreiben kann; die Überlappungen beginnen erst bei $w = 0,47$.

Abbildung 22 zeigt Berechnungen für zwei verschiedene Schalen "locker" gebundenes Wasser bei gleichem "harten" Kern ($r_2 = 3,0$ nm). Die Hinzunahme einer weiteren Wasserhülle ändert an der Kurvenform nur wenig, jedoch wird ein um den Faktor 10 kleinerer Wert für $(v_{1b} - v_{1f})$ benötigt, um die experimentellen Ergebnisse zu beschreiben.

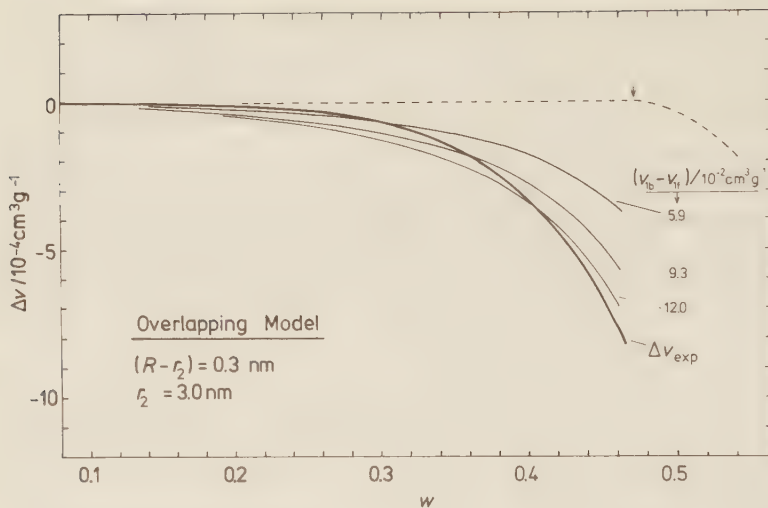


Abb. 21: Einfluss von $(v_{1b} - v_{1f})$ beim Überlappungsmodell $r_2 = 3,0$ und $(R - r_2) = 0,3$ nm angenommen. Die gewählten Werte für $(v_{1b} - v_{1f})$ entsprechen Normierungen bei verschiedenen Werten für w . Die Kurven sollen verdeutlichen, warum als Kompromiss für die übrigen Abbildungen eine Normierung bei $w = 0,36$ gewählt wurde. Der gestrichelten Kurve ist ein statisches Modell zugrundegelegt und $(v_{1b} - v_{1f}) = 0,1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ angenommen.

Die Abbildungen 20 und 22 zeigen, dass die Kurvenform sehr empfindlich von der Grösse von r_2 abhängen, jedoch kaum eine Aussage über $(R - r_2)$ möglich ist. Damit sind Aussagen über den Wert von $(v_{1b} - v_{1f})$ erst dann möglich, wenn von anderer Seite mehr über die Anzahl der "locker" gebundenen Wasserschichten bekannt ist.

In Abbildung 23 werden schliesslich beide Modelle, das Überlappungsmodell und das kooperative Modell, miteinander verglichen.

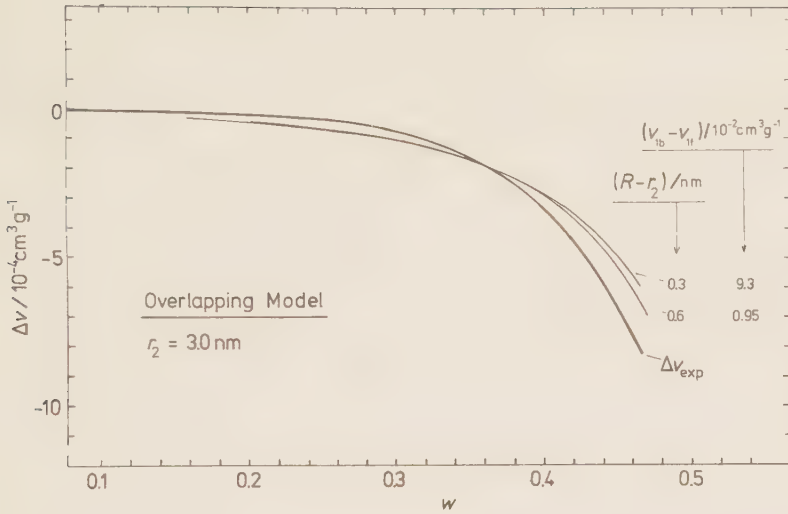


Abb. 22: Einfluss von $(R-r_2)$ beim Überlappungsmodell auf die Kurvenform, $r_2=3,0 \text{ nm}$ angenommen. Man beachte, dass der benötigte Wert für $(v_{1b}-v_{1f})$ um den Faktor $\frac{1}{10}$ abnimmt, wenn eine weitere Wasserhülle hinzugenommen wird.

In beiden Fällen ist $r_2=3,0 \text{ nm}$ und $(R-r_2)=0,3 \text{ nm}$ angenommen, der zusätzliche Parameter γ beim kooperativen Modell ist $\gamma=\frac{1}{2}$ gewählt worden (s. Gl. 45 und Abb. 16).

Die Kurvenform ändert sich nur wenig. Im Vergleich zum Überlappungsmodell werden beim kooperativen Modell allerdings grössere Bereiche erfasst, in denen sich die Wasserstruktur ändern kann. Daher sind die Werte $(v_{1b}-v_{1f})$ kleiner. Für $\gamma=\frac{1}{2}$ ergibt sich eine Reduzierung des Wertes $(v_{1b}-v_{1f})$ etwa um den Faktor 5. Das wichtigste Ergebnis ist jedoch, dass die Vorzeichen von $(v_{1b}-v_{1f})$ bei beiden Modellen verschieden sind. Das allerdings steckt bereits im Ansatz der Modelle.

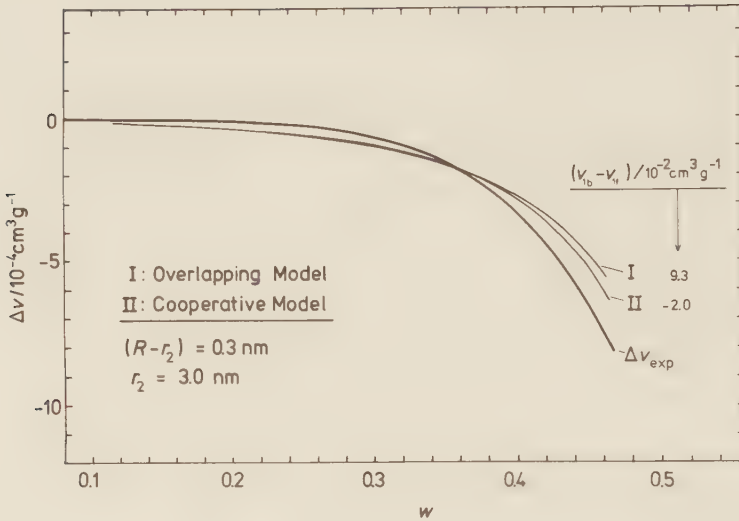


Abb. 23: Vergleich des Überlappungsmodells und des kooperativen Modells mit der gemessenen Kurve. Für beide Modelle ist $r_2 = 3,0 \text{ nm}$ und $(R-r_2) = 0,3 \text{ nm}$ angenommen, für den zusätzlichen Parameter γ beim kooperativen Modell ist $\gamma = \frac{1}{2}$ verwendet worden.

Pauly⁵⁷ hat für das Überlappungsmodell Näherungsformeln berechnet. Der Vergleich mit den numerischen Rechnungen zeigt, dass bei der Unsicherheit, die sich durch die Annahme eines so einfachen Modells ergibt, Näherungsformeln gute Ergebnisse liefern.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis des thermodynamischen Zustandes des Zytoplasmas und des Wassers in der Zelle liefern. Dazu wurden Dichtemessungen an wässrigen Hämoglobin-Salzmischungen sowie an Erythrozyten durchgeführt.

Die Dichte wurde bei 25°C mit einem digitalen Densimeter gemessen. Aufgrund des Messprinzips (Frequenzmessung eines mechanischen Oszillators) ist es möglich, die Dichte von kleinen Messproben mit einer Genauigkeit von $2 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ zu bestimmen. Die Hämoglobinkonzentration in den Mischungen wurde bis zu einem Massengehalt w von 0,45 g Hämoglobin pro g Mischung ausgedehnt. Der Massengehalt wurde über die Trockenmasse nach einer Serie von Trocknungsverfahren bestimmt. Dieses Verfahren ist gegenwärtig das genaueste. Die Unsicherheit in der Bestimmung des Massengehalts lag zwischen 2×10^{-5} und 4×10^{-4} , abhängig vom Massengehalt selbst.

Die Untersuchungen erfolgten in drei aufeinanderfolgenden Stufen zunehmender Komplexität: zunächst wurden salzfreie Hämoglobin-Wasser-Mischungen untersucht (Hb vom Rind), dann der Einfluss eines Salzes studiert (NaCl) und schliesslich an Erythrozytensedimenten gemessen (Erythrozyten vom Rind). In allen Messreihen nimmt das spezifische Volumen v (reziproke Dichte) in erster Näherung linear mit dem Massengehalt w der Mischung ab. Jedoch werden - abhängig vom Salz- und Hb-Gehalt - kleine Abweichungen von dieser Linearität beobachtet. Die Daten für v in Abhängigkeit von w wurden durch Potenzreihen approximiert. Die Abweichungen des spezifischen Volumens von einer linearen $v(w)$ -Beziehung bei hohen Konzentrationen sind etwa 0,1%. Um sicher zu gehen, dass die bei hohen Konzentrationen sehr viskösen Mischungen keinen Einfluss auf die Frequenz des mechanischen Schwingers haben, wurde die Möglichkeit eines solchen Artefakts sorgfältig untersucht. Die Schwingungsfrequenz wird erst bei sehr viel grösseren Viskositäten beeinflusst. Im einzelnen lassen sich die Ergebnisse der drei Untersuchungsreihen wie folgt zusammenfassen.

Wasser-Hämoglobin-Mischungen

In salzfreien Hämoglobinmischungen ist das partielle spezifische Volumen des Wassers und das des Hämoglobins bis zu einem Massengehalt

von $w=0,2$ praktisch konstant. Für das partielle spezifische Volumen des Hämoglobins in verdünnten Lösungen ergibt sich ein Wert von $0,75305 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Für grössere Hb-Konzentrationen nimmt bis $w=0,45$ das partielle spezifische Volumen des Wassers um etwa 0,3% gegenüber dem Wert in verdünnten Lösungen zu, und das partielle spezifische Volumen des hydratisierten Hämoglobinmoleküls um etwa 0,8% ab.

Diese relativ kleinen, aber hochsignifikanten Änderungen können beschrieben werden, wenn man eine Wechselwirkung der Proteinmoleküle mit ihren Wasserhüllen untereinander annimmt. Eine andere Möglichkeit der Volumenänderung bei hohen Hb-Konzentrationen durch Protonendissoziation konnte ausgeschlossen werden.

Die Volumenänderungen können quantitativ durch ein statistisches Kollisionsmodell einer Suspension von Kugeln beschrieben werden. Dem Proteinmolekül wird ein Anteil spezifisch gebundenes Wasser zugeordnet, welches sich innerhalb des Proteinmoleküls und an dessen Oberfläche befindet. Das an der Oberfläche "fest" gebundene Wasser soll beim Stoss zweier Proteinmoleküle unverändert bleiben, daher sind aus den Dichtemessungen mit Hilfe der hier angewandten Modellvorstellung keine Aussagen über das spezifische Volumen dieser fest gebundenen Wasserhülle möglich. Die Modellrechnungen liefern Kurvenformen, die stark vom Radius des "harten Kerns" abhängen. Dadurch ist eine Bestimmung des effektiven Durchmessers der Proteinmoleküle mit ihrer festen Wasserhülle möglich. In diesem Fall ergibt sich ein Kugelradius von etwa 3,15 nm, was einem Hb-Molekül mit einer einzigen Wasserhülle entspricht.

Zusätzlich zu diesem "harten Kern" wird dem Proteinmolekül noch ein unspezifisch gebundener Wasseranteil zugeordnet, der an der Wechselwirkung beteiligt ist. Für die Wechselwirkung werden zwei alternative Modelle vorgeschlagen. Das Ergebnis der Modellrechnungen ist, dass die Annahme von einer oder zwei weiteren unspezifisch gebundenen Wasserschichten ausreichend ist, um die Messergebnisse bei hochkonzentrierten Mischungen zu beschreiben. Die Unterschiede zwischen der berechneten Kurve und der gemessenen sind im gesamten Konzentrationsbereich kleiner als $10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ oder etwa 0,01%. Für das spezifische Volumen des "locker" gebundenen Wassers ergeben sich Werte, die sich - je nach angenommener

Schichtdicke - um 0,5 bis 10% von den Werten des freien Wassers unterscheiden. Die Annahme von noch mehr Schichten Wasser, die vom Proteinmolekül beeinflusst werden, ist nicht notwendig, da sich dann die Dichte dieses Wassers von dem des normalen Wassers praktisch nicht unterscheidet.-

Wasser-Hämoglobin-Natriumchlorid-Mischungen. Bei den Hämoglobin-Salzmischungen wurde das Massenverhältnis zwischen NaCl und Hb in jeder der drei Messreihen konstant gehalten und nur der Wassergehalt geändert. Die Molalität von NaCl war 75, 100 und 200 mmol pro kg Wasser in einer Mischung mit 350g Hb pro kg Mischung. Das spezifische Volumen dieser ternären Mischungen zeigt die charakteristischen Züge der binären Mischungen, nämlich die der Elektrostriktion (H_2O -NaCl-Mischungen) und die der Protein-Protein-Wechselwirkung (H_2O -Hb-Mischungen). Das spezifische Volumen dieser Mischungen kann jedoch nicht quantitativ aus einer Überlagerung der Volumeneigenschaften der reinen Hb- und NaCl-Mischungen erklärt werden, da Protein-Salz-Wechselwirkungen stattfinden. Im linearen Bereich der Funktion $v(w)$ ist das partielle spezifische Volumen der Festkomponente (Hb+NaCl) um etwa 0,1% grösser als der Wert, der aus den binären H_2O -Hb- und H_2O -NaCl-Mischungen berechnet wurde. Die Differenz kann erklärt werden, wenn man eine Bindung des Chloridions an das Hämoglobinmolekül annimmt.

Erythrozyten. Durch osmotische Vorbehandlung von Rindererythrozyten wurde eine Schwellung bzw. Schrumpfung der Zellen innerhalb physiologischer Grenzen erreicht. Die Konzentrationsbestimmung der hauptsächlich in der Zelle vorkommenden Salze zeigte, dass tatsächlich nur Wasserverschiebungen stattfanden. Die Dichtemessungen bei 25°C an gepackten Sedimenten der so behandelten Erythrozyten erlaubten wieder Aussagen über das partielle spezifische Volumen des Wassers und das der Trockenkomponente. Die Werte entsprechen denen von Hämolysaten, die durch mehrfaches langsames Einfrieren und Auftauen von Erythrozyten gewonnen wurden. Das partielle spezifische Volumen der Trockenkomponente lässt sich jedoch nur angenähert aus den Komponenten additiv berechnen, weil nicht alle Werte für das partielle spezifische Volumen der Einzelkomponenten bekannt sind. Für das partielle spezifische Volumen des Wassers in Erythrozyten ergibt sich ein Wert von $1,00445 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ bei 25°C. Dieser Wert ist um etwa 0,15% grösser

als der Wert für das spezifische Volumen des normalen Wassers. Die Erhöhung ist jedoch etwa dreimal so gross, wie nach den Messungen an Hb-NaCl-Mischungen und aus der Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle untereinander zu erwarten war. Die Erhöhung kann heute noch nicht erklärt werden. Inwieweit Membranlipide dabei eine Rolle spielen, soll durch Dichtemessungen an Ghosts von Erythrozyten untersucht werden.

Eine Erhöhung des partiellen spezifischen Volumens des Wassers in Erythrozyten um 0,15% im Vergleich zum Wert des normalen Wassers entspricht einer Vergrösserung des spezifischen Volumens des normalen Wassers bei einer Temperaturerhöhung von 5°C. Von einer besonderen Struktur des gesamten Wassers in der Zelle, die sich in einer deutlich messbaren Änderung des spezifischen Volumens des Wassers bemerkbar machen sollte, kann man nach den hier beschriebenen Dichtemessungen in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit anderen Methoden nicht sprechen.

8. Literatur

- (1) J.L. Anderson and J.A. Quinn, *Biophys.J.*, 14, 130 (1974)
- (2) P. Andrews, *Biochem.J.*, 91, 222 (1964)
- (3) P.T. Beall, C.F. Hazlewood and P.N. Rao, *Science*, 192, 904 (1976), and 194, 214 (1976)
- (4) J. Behlke and I. Wandt, *Acta Biol. Med. Ger.*, 31, 383 (1973)
- (5) H.J.C. Berendsen, in "Water-A Comprehensive Treatise", ed. F. Franks, Plenum, New York, 1974
- (6) E. Berlin, P.G. Kliman, and M.J. Pallansch, *J. Colloid Interface Sci.*, 34, 488 (1970)
- (7) J. Bernhardt and H. Pauly, *J. Phys. Chem.*, 79, 584 (1975)
- (8) J. Bernhardt and H. Pauly, *J. Phys. Chem.*, in Press (1977)
- (9) P.R. Bevington, "Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences", McGraw Hill Book Comp., New York, 1967
- (10) P.H. Bigg, *Brit. J. Appl. Phys.*, 18, 521 (1967)
- (11) W. Bode, P. Schwager and R. Huber, in "Proceedings of the 10th FEBS Meeting", Paris, 1975
- (12) W. Bode and P. Schwager, *J. Mol. Biol.*, 98, 693 (1975)
- (13) M. Böttger, *studia biophysica*, 38, 45 (1973)
- (14) S. Brandt, "Datenanalyse", Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, 1975
- (15) K.R. Brownstein, C.E. Tarr, *Science*, 194, 213 (1976)
- (16) H.B. Bull, *J. Amer. Chem. Soc.*, 66, 1499 (1944)
- (17) H.B. Bull and K. Breese, *J. Phys. Chem.*, 72, 1817 (1968)
- (18) H.B. Bull and K. Breese, *Arch. Biochem. Biophys.*, 128, 497 (1968)
- (19) C.W. Carr, *Arch. Biochem. Biophys.*, 46, 417 (1953)
- (20) C.W. Carr, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 476 (1956)
- (21) R. Cooke and I.D. Kuntz, *Ann. Rev. Biophys. Bioengineering*, 3, 95 (1974)
- (22) F.W. Cope, *Biophys. J.*, 9, 303 (1969)
- (23) F.W. Cope, *Science*, 193, 532 (1976)
- (24) R. Damadian, *Science*, 193, 528 (1976)
- (25) D.L. Drabkin, *J. Biol. Chem.*, 164, 703 (1946)
- (26) D. Eisenberg and W. Kauzmann, "The Structure and Properties of Water", University Press, Oxford, 1969
- (27) F. Franks, "Water - A Comprehensive Treatise", Plenum, New York, Vol.I - Vol. V, 1975
- (28) E.A. Guggenheim, "Thermodynamics", 5th ed., North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1967
- (29) G. Hasl, *Habilitationsschrift*, Erlangen 1973

- (30) G. Hasl and H. Pauly, Biophysik, 10, 125 (1973)
- (31) C.F. Hazlewood (ed): "Physicochemical State of Ions and Water in Living Tissues and Model Systems", Ann. N.Y. Acad. Science, 204, (1973)
- (32) C.F. Hazlewood, Science, 193, 532 (1976)
- (33) J.A. Hinson and T.L. McMeekin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 94 (1969)
- (34) A.L. Hodgkin and A.F. Huxley, J. Physiol., 117, 500 (1952)
- (35) R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer and T.A. Jones, In: "Bayer Symposium V on Proteinase Inhibitors" (H. Fritz u.a., eds), pp 497, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1974
- (36) M.J. Hunter, J. Phys. Chem., 70, 3285 (1966)
- (37) M.J. Hunter, J. Phys. Chem., 71, 3717 (1967)
- (38) S. Katz, J.K. Crissman, and L.C. Roberson, J. Biol.Chem., 249, 7892 (1974)
- (39) W. Kauzmann, A. Bodanszky, and J. Rasper, J. Amer. Chem. Soc., 84, 1777 (1962)
- (40) G.B. Kolata, Science 192, 1220 (1976)
- (41) O. Kratky, H. Leopold, and H. Stabinger, Z. angew. Phys., 27, 273 (1969)
- (42) I.O. Kuntz and W. Kauzmann, Adv. Protein Chem. 28, 239 (1974)
- (43) D.W. Kupke, In: "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry", (S.J. Leach, Ed.), Academic Press 1973
- (44) G.N. Ling, "A Physical Theory of the Living State", Blaisdell Publ. Co., New York - London, 1962
- (45) G.N. Ling, in "Water and Aqueous Solutions", ed. R.A. Moore, Wiley, New York, 1972
- (46) G.N. Ling, C.L. Walton, Science, 191, 295 (1976)
- (47) G.N. Ling, Science, 193, 530 (1976)
- (48) F.J. Millero, J. Phys. Chem., 74, 356 (1970)
- (49) C. Migchelsen and H.J.C. Berendsen, J. Chem. Phys., 59, 296 (1973)
- (50) G.M. Mrevlishvili, P.L. Privalov, in "Water in Biological Systems", (L.P. Kayushin, Ed.), New York, Consultants Bureau, 1969
- (51) R. Müller, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 1976
- (52) I. Oakes, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I., 72, 216 (1976)
- (53) H. Pauly, Nature, 183, 333 (1959)
- (54) H. Pauly, Biophysik, 1, 143 (1963)
- (55) H. Pauly and H.P. Schwan, Biophys. J., 6, 621 (1966)

- (56) H. Pauly, Biophysik, 10, 7 (1973)
- (57) H. Pauly, nicht publiziert
- (58) M.F. Perutz et.al., Biochemistry 15, 378 (1976)
- (59) H. Pfister and H. Pauly, J. Polymer Sci., Part C, 39, 179 (1972)
- (60) G. Philipp danke ich für die Programmierung der Modellrechnungen an der PDP 8
- (61) I. Pilz und G. Czerwenka, Makromol. Chem., 170, 185 (1973)
- (62) W. Pilz, I. Johann, and A.T. Boo, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 2, 179 (1973)
- (63) J. Rasper and W. Kauzmann, J. Amer. Chem. Soc., 84, 1771 (1962)
- (64) D. Rosen, Transact. Faraday Soc., 59, 2178 (1963)
- (65) A.H. Rosenfeld, et.al., Rev. Mod. Phys., 33, 1 (1967)
- (66) H. Saechtling und W. Zebrowski, "Kunststoffaschenbuch", 17. Aufl., C. Hanser, München, 1967
- (67) G. Scatchard and E.S. Black, J. Phys. and Colloid Chem., 53, 88 (1949)
- (68) G. Scatchard, I.H. Scheinberg, and S.H. Armstrong, J. Amer. Chem. Soc., 72, 535 (1950)
- (69) G. Scatchard, J.S. Coleman, and A.L. Shen, J. Amer. Chem. Soc., 79, 12 (1957)
- (70) G. Scatchard, Y.V. Wu, and A.L. Shen, J. Amer. Chem. Soc., 81, 6104 (1959)
- (71) H. Schüssler möchte ich für die Durchführung der Gelchromatographie danken.
- (72) H.P. Schwan, G. Schwarz, J. Maczuk, and H. Pauly, J. Phys. Chem., 66, 2626 (1962)
- (73) H.P. Schwan, Ann. N.Y. Acad. Sci., 125, 344 (1965)
- (74) H. Stabinger, H. Leopold, O. Kratky, Monatsh. Chem., 98, 436 (1967)
- (75) H. Stabinger, Dissertation, Universität Graz, 1969
- (76) H. Stabinger und O. Kratky möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Probleme in ihren Laboratorien untersuchen zu können.
- (77) N. Tretter, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 1975
- (78) A.S. Troshin, "Problems of Cell Permeability", Oxford, Pergamon Press, 1966
- (79) W.W. Umbreit, R.H. Burris, J.F. Stauffer (eds), "Manometric Techniques", 4th Ed., Burgess Publ. Comp., Minneapolis, 1964
- (80) M. Weissbluth, "Hemoglobin", Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1974
- (81) H.E. Wirth and F.K. Bangert, J. Phys. Chem., 76, 3488 (1972)
- (82) J.W. Woodbury, Science, 193, 532 (1976)

Copy-Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197